

**Entwicklung eines mehrstufigen Screening-Verfahrens zur
Identifizierung maßgeschneiderter Wirkstofftransporter**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von M. Sc. Dario Remmler

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hans G. Börner
 2. PD Dr. Michael G. Weller
 3. Dr. habil. Jean-François Lutz

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2019

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans G. Börner am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Oktober 2014 bis April 2018 angefertigt.

Kurzzusammenfassung

Geringe Wasserlöslichkeiten kleiner organischer Wirkstoffkandidaten, sogenannter Leitstrukturen, sind in der Medikamentenentwicklung häufig für das Scheitern vielversprechender Projekte verantwortlich. Um diese Kandidaten dennoch zur Marktreife bringen zu können, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Neben der kostenintensiven Strukturoptimierung rücken Formulierungsadditive in den Fokus, die in der Lage sind, Wirkstoffe zu solubilisieren, transportieren und gezielt freizusetzen.

In dieser Arbeit wird eine Hochdurchsatz-Screening-Methode präsentiert, die eine schnelle und arbeitsexensive Identifizierung maßgeschneiderter Binder für wasserunlösliche, niedermolekulare Wirkstoffe ermöglicht und mithilfe derer Löslichkeitsvermittler in Form von Peptid-Polymer-Konjugaten mit definierten Solubilisierungs- und Freisetzungseigenschaften realisiert werden können. Dazu werden Peptidbibliotheken in einem zweistufigen Prozess zuerst auf Wirkstoffbindung und nachfolgend auf Wirkstofffreisetzung durchsucht. Das Screening kann aufgrund einer innovativen *on-chip* Immobilisierung der Peptidbibliothek und der intrinsischen Fluoreszenz der niedermolekularen Wirkstoffe halb-automatisiert durchgeführt werden. Vielversprechende Peptidsequenzen können anschließend direkt *on-chip* mittels MALDI-ToF-MS² bzw. fragmentierungsfrei sequenziert und löslichkeitsvermittelnde Peptid-PEG-Konjugate hergestellt werden.

In einem Testsystem wurden maßgeschneiderte Peptid-PEG-Konjugate mit unterschiedlichen Freisetzungseigenschaften für einen potentiellen ALZHEIMER-Wirkstoff realisiert und sowohl Solubilisierungseigenschaften in Beladungsexperimenten, als auch die Freisetzungseigenschaften in einem vereinfachten Blutplasmamodell mittels Fluoreszenzanisotropie und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestätigt. In Zelltests mit einer Neuro-2a-Zelllinie konnten durch Zugabe der Wirkstoff-Transporter-Komplexe effektiv die Ausbildung der bei einer ALZHEIMER-Erkrankung auftretenden Tau-Protein-Aggregate bis zu 55 % reduziert werden. Damit stellen Peptid-PEG-Konjugate eine vielversprechende Alternative zu klassischen Löslichkeitsvermittlern wie z. B. Kolliphor EL, einem PEGylierten Rizinusöl, dar, welches den Wirkstoff zwar gut bindet und solubilisiert, jedoch nicht definiert freigibt. Die vorgestellte Screening-Methode beschränkt sich nicht nur auf Wirkstoff-Screenings, sondern konnte ebenfalls auf Fragestellungen der anorganischen Cluster-Chemie übertragen werden. Hierbei wurden selektiv bindende Peptide selektiert, die den Metalloxo-Cluster binden und stabilisieren, um nachträgliche Funktionalisierungen des Komplexes zu ermöglichen. Es zeigte sich, dass oberflächenmodifizierte, polynukleare Cluster als Markierungsreagenzien in elementar-massenspektrometrischen Experimenten aufgrund der guten Signalintensitäten eine Alternative zu mononuklearen Lanthanoid-Markierungsreagenzien darstellen.

Abstract

Low water solubility of promising small organic drugs is one of the main reasons for failures during early drug development. Solubilizers promise to overcome these difficulties by solubilization, improved transport and final release of the potential drug candidates, which may result in an approval as a commercial drug. Here, a high-throughput screening method is presented, which is capable of identifying tailor-made peptide-polymer conjugates binding small molecule drugs, which can be used to act as solubilizers with precisely defined drug uptake and release properties. The screening is based on a two-dimensional process, which in a first step identifies strong binders and in a second, characterises their drug release. Due to its innovative *on-chip* immobilization of the peptide library and the intrinsic fluorescence of the small molecule drugs, the screening can be performed semi-automatically. Promising peptides can be sequenced directly by *on-chip* fragmentation-free or via MALDI-ToF-MS² and subsequently peptide-PEG conjugates can be synthesized. A screening against a high potential ALZHEIMER's disease drug resulted in several tailor-made peptide-PEG conjugates with various drug uptake and release characteristics, which were confirmed in additional experiments. Here, loading capacities were determined and release properties analysed with a simplified blood plasma-model utilizing fluorescence anisotropy and fluorescence correlation spectroscopy. Cell tests with a Neuro-2a cell line confirmed the effectiveness of the drug-transporter aggregates by reducing the tau-protein concentration by 55 % and inhibiting their aggregation, which is one of the key issues in ALZHEIMER's disease. Thereby, peptide-PEG conjugates offer a promising alternative to traditional solubilizers, such as the PEGylated castor oil-based Kolliphor EL, which binds and solubilizes the drug, but suffers from low release rates.

The presented screening procedure was also utilized to identify strong binders for an inorganic metal oxido cluster, offering a platform for further functionalization. The surface-modified polynuclear metal oxido clusters showed strong signals in elemental mass-spectrometry measurements and offer an alternative to single lanthanide tags in biomedical applications.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Zielstellung	1
2	Stand der Forschung	3
2.1	Medikamentenentwicklung im Überblick	3
2.1.1	Herausforderungen der Medikamentenentwicklung	5
2.2	Transport hydrophober Wirkstoffe.....	7
2.2.1	Lipid- und polymerbasierte Transportsysteme.....	8
2.2.2	Zielgerichteter Wirkstofftransport	11
2.2.3	Peptid-Polymer-Konjugate als Wirkstofftransporter	12
2.2.4	Screening-Methode zu Identifizierung von Bindern.....	15
2.3	Demenzerkrankungen	17
2.3.1	Grundlagen der ALZHEIMER-Erkrankung.....	18
2.3.2	Behandlung der ALZHEIMER-Krankheit	20
2.3.3	Rhodanin-basierte Wirkstoffe.....	21
3	Ergebnisse und Diskussion	24
3.1.1	Konzept einer erweiterten Screening-Methode.....	25
3.1.2	Entwicklung der Screening-Methode	26
3.1.3	Design der Screening-Methode	33
3.2	Screening von BB17 gegen eine Peptidbibliothek.....	37
3.2.1	Identifikation maßgeschneiderter Peptidsequenzen.....	37
3.2.2	Sequenzierung der Peptide	39
3.2.3	Synthese und Charakterisierung der Peptid-Polymer-Konjugate.....	42
3.2.4	Einfluss der Aggregatbildung auf die Wirkstoffsolubilisierung	44
3.3	Wirkstofffreisetzung der Konjugate	46
3.4	Entwicklung einer fragmentierungsfreien Screening-Methode	54
3.4.1	Design der Leiterbibliothek.....	55
3.4.2	Vergleich der Leiterbibliotheken mit klassischer Fragmentierung	59
3.4.3	Screening von BB17 gegen die Leiterbibliothek	60
3.5	Entschlüsselung von binären Präzisionspolymeren.....	62
3.5.1	Codierte Oligoalkoxyaminamide	63
3.5.2	Codierte Oligophosphodiester	67
3.6	Modifizierung der Peptid-Polymer Architektur	70
3.6.1	Einbau eines hydrophoben Segments.....	70
3.6.2	Veränderung der PEG-Größen	73
3.6.3	Verzweigung der Bindungsdomäne.....	74

3.7	Peptid-Polysarkosin-Konjugate als Wirkstofftransporter	75
3.8	Untersuchung der Wirkstofffreisetzung in Zelltests	78
3.8.1	Aktivitäten der Konjugat-Wirkstoff-Komplexe	79
3.8.2	Aktivitäten modifizierter Konjugat-Wirkstoff-Komplexe	81
3.9	Bibliotheksscreening eines anorganischen Bismut-oxido-Clusters	85
3.9.1	Konzept des Screenings	86
3.9.2	Identifizierung von Cluster-Bindern	87
4	Zusammenfassung und Ausblick	92
5	Experimenteller Teil	95
5.1	Verwendete Chemikalien	95
5.2	Synthese von BB17	97
5.3	Synthese von Fmoc-Mini-PEG-OH	97
5.4	Synthese der <i>Split&Mix</i> Peptidbibliotheken	98
5.5	Screening gegen nicht-immobilisierte Bibliotheken	102
5.6	Immobilisierung der Peptidbibliotheken	102
5.7	Screening gegen immobilisierte Bibliotheken	103
5.8	Sequenzierung der Peptide	104
5.9	Synthese der Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate	105
5.10	Vorschriften zur Charakterisierung der Peptid-PEG-Konjugate	107
5.11	Solubilisierung der Wirkstoffe	108
5.12	Untersuchung der Wirkstofffreisetzungen	109
5.13	Größenbestimmung der Aggregate mittels DLS und Kryo-TEM	111
5.14	Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration	113
5.15	<i>In vitro</i> Tests und Zelltests	114
5.16	Synthese der Polymere für fragmentierungsfreie Sequenzierung	115
5.17	Synthese von Pep ₃ -PSar	119
5.18	Bibliotheksscreening gegen MK1	119
6	Anhang	121
6.1	Ergebnisse der Bibliotheksscreenings	121
6.2	Produktcharakterisierungen	127
7	Literaturverzeichnis	145
8	Abkürzungsverzeichnis	158
9	Danksagung	161

1 Motivation und Zielstellung

Circa 40 % der momentan auf dem Markt verfügbaren pharmazeutisch aktiven Substanzen sind wasserunlöslich bzw. schwer wasserlöslich.¹ Dies schränkt nicht nur die Anwendbarkeit dieser Substanzen als Arzneimittel ein, sondern kann dazu führen, dass Zulassungen nicht erteilt werden. Formulierungsadditive oder *Drug-Delivery-Systeme* (DDS) sind oftmals in der Lage, die größtenteils niedermolekularen Wirkstoffe zu solubilisieren und transportieren, wobei die Formulierungsadditive die Wirkstoffe zumeist unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen binden.

Kürzlich wurden Peptid-Polymer-Konjugate als bioinspirierte Formulierungsadditive beschrieben, die in der Lage sind spezifisch mit den Wirkstoffen zu interagieren und diese in Aggregaten zu solubilisieren. Dabei binden die Peptide die Wirkstoffe sequenz- und strukturabhängig über nicht-kovalente Wechselwirkungen und das hydrophile, synthetische Polymer Polyethylenoxid (PEG) sorgt für eine ausreichende Wasserlöslichkeit der Aggregate.² Die Identifikation der wirkstoffbindenden Peptide erfolgte dabei über Screenings der Wirkstoffe gegen kombinatorische, festphasengebundene Peptidbibliotheken. Dabei stand die Selektion von Bindungspeptiden mit hoher Wirkstoffbindungskapazität im Fokus, wohingegen die für Bioanwendungen relevanten Wirkstofffreisetzungseigenschaften in den Screenings nicht berücksichtigt wurden, sondern nachträglich bestimmt werden mussten.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Screening-Methode zu entwickeln, die eine aufeinanderfolgende Bestimmung der Wirkstoffbindungskapazitäten und -freisetzungseigenschaften von Peptiden ermöglicht. Dazu ist es notwendig, die Peptidbibliotheken während des Screenings permanent zu immobilisieren, um mehrstufige Selektionsprozesse durchzuführen. Zur Herstellung der kombinatorischen Peptidbibliotheken wurde auf die Split&Mix-Methodik zurückgegriffen, mit der sich ein großer Sequenzraum an Aminosäurekombinationen abdecken lässt. Nach Abschluss des Screenings sollen die Peptide von den selektierten Festphasen abgespalten und sequenziert werden. Dazu soll zum einen auf die etablierte Fragmentierung (MALDI-ToF-MS²) mit anschließender softwareunterstützter Auswertung und zum anderen auf die Methodik der Leiterbibliotheken zurückgegriffen werden. Letztere ermöglicht eine fragmentierungsfreie Sequenzierung

durch definiert eingebaute Abbruchsequenzen auf dem Trägermaterial. Die gewonnenen Informationen sollen anschließend genutzt werden, um Wirkstofftransporter zu realisieren, die maßgeschneiderte Wirkstofffreisetzungseigenschaften aufweisen.

Als Testverbindung wurde der potentielle ALZHEIMER-Wirkstoff BB17ⁱ gewählt, der als Inhibitor der pathologischen Tauproteinaggregation in Neuronen wirken soll. BB17 zeigt ein hohes Inhibierungspotential der Tauproteinaggregation, welches jedoch aufgrund der geringen intrinsischen Wasserlöslichkeit nicht vollständig ausgeschöpft werden kann. In ersten etablierten Screenings gegen Peptidbibliotheken wurden bereits bindende Peptide identifiziert, die als Teil von Peptid-Polymer-Konjugaten BB17 solubilisieren und vielversprechende Ergebnisse in Zelltests liefern.³⁻⁴

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollen nun Peptid-Polymer-Konjugate realisiert werden, die sich für einen Wirkstofftransport in kompetitiven Umgebungen eignen. Dazu gilt es die Wirkstofffreisetzungseigenschaften in einem Blutplasmamodell mit diversen Methoden zu untersuchen und zu charakterisieren. In anschließenden Zelltests sollen die Konjugat-Wirkstoff-Komplexe positive Effekte auf die Inhibierung der Tauproteinaggregation zeigen.

ⁱ BB17 wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. MANDELKOW vom Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Krankheiten, Bonn, zur Verfügung gestellt.

2 Stand der Forschung

2.1 Medikamentenentwicklung im Überblick

Der weltweite Bedarf an neuen Medikamenten wächst kontinuierlich.⁵ Die Gründe dafür sind vielfältig: Zum einen wird die Bevölkerung immer älter, womit die Nachfrage für neue Arzneimittel gegen Alterskrankheiten wie z. B. Krebs, Demenz und auch Diabetes steigt, zum anderen werden etablierte Wirkstoffe aufgrund von Resistenzbildungen unwirksam und erfordern äquivalenten Ersatz.⁶⁻⁷ Zusätzlich verlangt auch die Behandlung seltenerer, früher weitestgehend ignorierte Krankheiten, sogenannter *Orphan Diseases* (aus dem Englischen: seltene Leiden), nach der Entwicklung neuer Medikamente. Während im 20. Jahrhundert nur wenige Medikamente zur Behandlung von *Orphan Diseases* entwickelt wurden, stieg der Anteil an neu zugelassenen Arzneimitteln aufgrund verschiedener Verordnungen und Gesetze in den letzten Jahren auf mehr als 25 %.⁸

Gleichzeitig wird die Entwicklung neuer Wirkstoffe immer regulierter und somit kostenintensiver.⁹⁻¹⁰ Der Grund hierfür ist offensichtlich: Die gut erforschten und leicht zu behandelnden Krankheiten werden bereits erfolgreich durch die Pharmaindustrie abgedeckt; übrig bleiben komplizierte und unzureichend erforschte Krankheitsmechanismen. Für die Pharmakonzerne ist es zwingend notwendig, neue Medikamente zu entwickeln, um die Marktposition durch Patente zu stärken. Im Zuge der gestiegenen Entwicklungskosten hat sich jedoch die prognostizierte Kapitalrendite der Forschung und Entwicklung der zwölf größten Biopharmaunternehmen 2017 auf nur noch 3.2 % reduziert – ausgehend von 10.1 % in 2010.¹¹ Dies liegt darin begründet, dass die Hürden einer erfolgreichen Medikamentenzulassung gestiegen sind, womit die überwiegende Mehrheit der vielversprechenden Präparate nie bis zur Marktreife entwickelt werden kann. Oftmals werden frühzeitig Eigenschaften identifiziert, die eine Zulassung unwahrscheinlich machen. Auch wenn in den letzten Jahren immer mehr neuartige Biopharmazeutika, also mittels Biotechnologie hergestellte Arzneimittel, entwickelt wurden, bilden niedermolekulare Wirkstoffe ($M \leq 900$ g/mol) seit Jahrzehnten die am häufigsten entwickelte Medikamentenklasse.¹² In den Jahren 1997 – 2016 erhielten insgesamt 594 Verbindungen eine Arzneimittelzulassung

der FDA (U.S.-amerikanische Behörde für Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung, *U.S. Food and Drug Administration*), davon 491 als neuartige niedermolekulare Verbindung und 103 als Biopharmazeutika.¹³⁻¹⁴ Dieser Trend setzte sich auch 2017 fort, indem insgesamt 45 neue Verbindungen eine Arzneimittelzulassung der FDA erhielten. Davon waren 62 % neuartige niedermolekulare Wirkstoffe und 38 % Biopharmazeutika. Der Anteil der Arzneimittel zur Behandlung von *Orphan Diseases* beträgt dabei 39 %, womit der Durchschnitt der letzten Jahre deutlich übertroffen wurde und sie somit die größte Arzneimittelgruppe bildet; dicht gefolgt von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen (26 %). 2017 wurde zwar ein 20-Jahreshoch an neu zugelassenen Arzneimitteln erreicht – ein vergleichbarer Wert wurde mit 59 neu zugelassenen Arzneimitteln zuletzt im Jahr 1996 beobachtet – jedoch lässt sich dies auf das schwache Jahr 2016 zurückführen, in dem nur 22 Arzneimittel zugelassen wurden.¹⁵⁻¹⁶

Die klassische Entwicklung von niedermolekularen Wirkstoffen umfasst mehrere Entwicklungsphasen (Abbildung 1)¹⁷: Am Anfang jeder Medikamentenentwicklung steht die

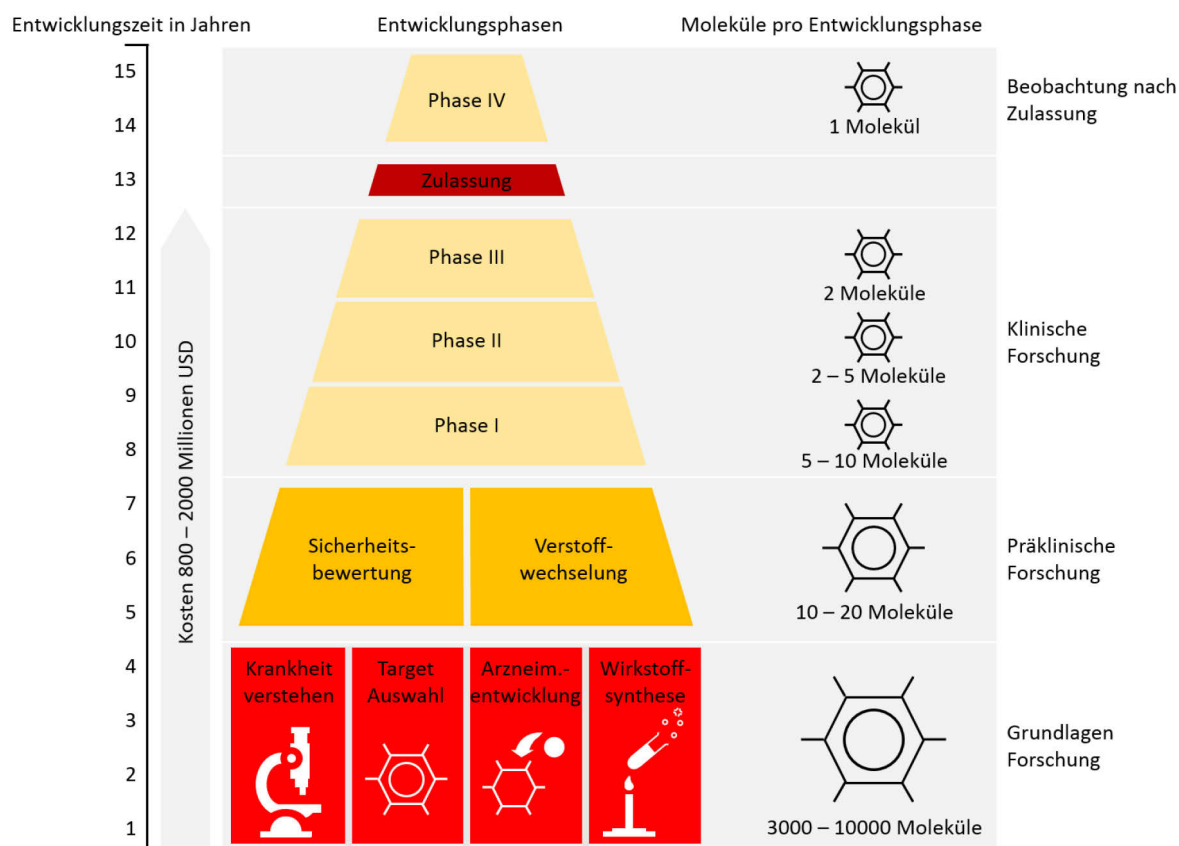


Abbildung 1. Phasen der Medikamentenentwicklung mit den entsprechenden Entwicklungszeiten.

Grundlagenforschung, bei der untersucht wird, welche Moleküle und Mechanismen für die Entstehung einer Krankheit verantwortlich sind. Anschließend wird ein *Target* (aus dem Englischen: Ziel) definiert, welches im Fokus der Entwicklung stehen soll. Die Arten der *Targets* können hierbei breit gefächert sein; die häufigsten sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (45 %), Enzyme (28 %), gefolgt von Hormonen und Wachstumsfaktoren (11 %) und Ionenkanälen (5 %).¹⁸⁻¹⁹ Nach der *Target*-Definition werden in Hochdurchsatz-Screenings oft mehrere Millionen Substanzen einer Molekülbibliothek auf die *Target*-Aktivität hin untersucht. Hierbei werden teilweise bis zu 10 000 verschiedene *Hits* (aus dem Englischen: Treffer) identifiziert, aus welchen, nach Evaluation und weiteren Modifikationszyklen, Leitstrukturen abgeleitet werden, die der präklinischen Phase zugeführt werden können.²⁰ Dort werden die toxikologischen Eigenschaften, die Aufnahme und Verteilung in Körper und Zellen und auch die Verstoffwechselung der Leitstrukturen untersucht. Diese Fragestellungen können dabei überwiegend mit Bakterien, Zell- und Gewebekulturen, *in vitro* oder auch in Tierversuchen geklärt werden. Die meisten Leitstrukturen weisen jedoch ungünstige pharmakologische Profile auf und werden aussortiert, womit es nach durchschnittlich sieben Jahren Entwicklungszeit nur ca. 10 - 20 Moleküle in die klinischen Phasen I-III schaffen.²¹ Hier werden die Leitstrukturen das erste Mal am Menschen getestet, wobei im Besonderen Wirksamkeit und Nebenwirkungen im Forschungsmittelpunkt stehen. Sollten auch hier alle notwendigen Kriterien erfüllt werden, steht der Zulassung eines neuen Wirkstoffes nichts mehr im Wege. Im Durchschnitt kostet die Entwicklung eines Wirkstoffes ca. 2 Mrd. US-Dollar und dauert ca. 15 Jahre.¹¹ Um die Entwicklungszeiten und Kosten zu reduzieren, gilt es daher frühzeitig Leitstrukturen zu evaluieren und unpassende Strukturen auszusortieren.

2.1.1 Herausforderungen der Medikamentenentwicklung

Es wird geschätzt, dass 90 % der auf dem Markt verfügbaren Wirkstoffe oral eingenommen werden.²² Auch wenn diese Art der Medikamenteneinnahme aufgrund der Einfachheit besonders vom Patienten präferiert wird, stellt sie eine der herausforderndsten Routen dar. Theoretisch bietet der Gastrointestinaltrakt mit seiner hohen Darmoberfläche das Potential für eine ausgezeichnete Wirkstoffabsorption und eine damit verbun-

dene hohe Bioverfügbarkeit.²³ Dies setzt eine ausreichende Wasserlöslichkeit und Permeabilität des Wirkstoffes voraus, was jedoch nur von einem geringen Teil der Wirkstoffe erfüllt wird. Immer mehr *Hits*, Leitstrukturen und auch zugelassene Arzneimittel weisen eine hohe Hydrophobie und eine damit verbundene geringe intrinsische Wasserlöslichkeit auf. So wird angenommen, dass circa 40 % der aktuell auf dem Markt verfügbaren Wirkstoffe und 75 % der sich momentan in der Entwicklung befindenden Leitstrukturen wasserunlöslich/schwer wasserlöslich sind.^{20,24-25} Dies hat hauptsächlich zwei Gründe. Zum einen werden traditionelle Hochdurchsatz-Screenings mit Molekülbibliotheken oft in Lösungsmittelgemischen durchgeführt (z. B. Wasser/Dimethylsulfoxid (Wasser/DMSO)), um Zielstruktur/*Target* Interaktionen zu identifizieren. Zum anderen basieren Interaktionen mit den *Targets* (z. B. Rezeptoren in der Zellmembran) häufig auf hydrophoben Wechselwirkungen, weshalb hauptsächlich lipophile/hydrophobe Leitstrukturen identifiziert werden.

Die schlechte Wasserlöslichkeit stellt einen Hauptgrund für das Scheitern vieler potentieller Wirkstoffe dar und verursacht immense Kosten (Abbildung 1). Leitstrukturoptimierungen können zwar durch das Einfügen ionischer oder polarer Gruppen die Löslichkeit der Moleküle teilweise verbessern, jedoch gehen diese Optimierungen oft mit einer Reduktion der Aktivität einher. In der Wirkstoffentwicklung wurden daher Regeln aufgestellt, die problematische Strukturen frühzeitig erkennen und von der weiteren Entwicklung ausschließen. Die wohl bekannteste Faustregel für eine gute orale Bioverfügbarkeit ist die von LIPINSKI im Jahr 1997 erstellte *Rule of Five* (aus dem Englischen: Regel der Fünf), die über die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, der Molekülmasse und dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient die Erfolgchancen einer Leitstruktur abschätzt.²⁶⁻²⁷ Demnach sollten die Leitstrukturen nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren und zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren besitzen, eine Molekülmasse von 500 Da nicht überschreiten und einen Verteilungskoeffizienten von maximal 5 aufweisen, um als potentielles Präparat weiterentwickelt zu werden. Seit Einführung der *Rule of Five* wurden viele Verbesserungen und Erweiterungen hinzugefügt, die im *GHOSE Filter* oder auch in

der *VERBER's Rule* Anwendung finden und die z. B. die Anzahl der Atome und die molekulare Brechung in die Bewertung einschließen.²⁷⁻²⁹

2.2 Transport hydrophober Wirkstoffe

Viele Wirkstoffe weisen diese Eigenschaften der guten Bioverfügbarkeit nicht auf und stellen damit potentielle Risikokandidaten in der Wirkstoffentwicklung dar. Daher wurden Wirkstofftransport-Systeme (DDS, *Drug Delivery System*) und Formulierungsadditive entwickelt, welche die Löslichkeit und die damit verbundene Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe erhöhen sollen.³⁰ Die Kombinationen aus Wirkstoff und Transportsystem unterliegen, genau wie die reinen Wirkstoffe, den Regularien der Zulassungsbehörden.³¹ Dennoch ist die Verwendung von Transportsystemen deutlich vielversprechender als die reine Leitstrukturentwicklung, da zum einen gestartete Projekte weitergeführt werden können, was Kosten vermeidet, zum anderen, weil bereits zertifizierte Wirkstoffe für weitere Anwendungen optimiert und zugelassen werden können.^{1,32} So können über die Zugabe von Additiven z. B. Wirkstoffe stabilisiert und gezielter Transport realisiert werden.

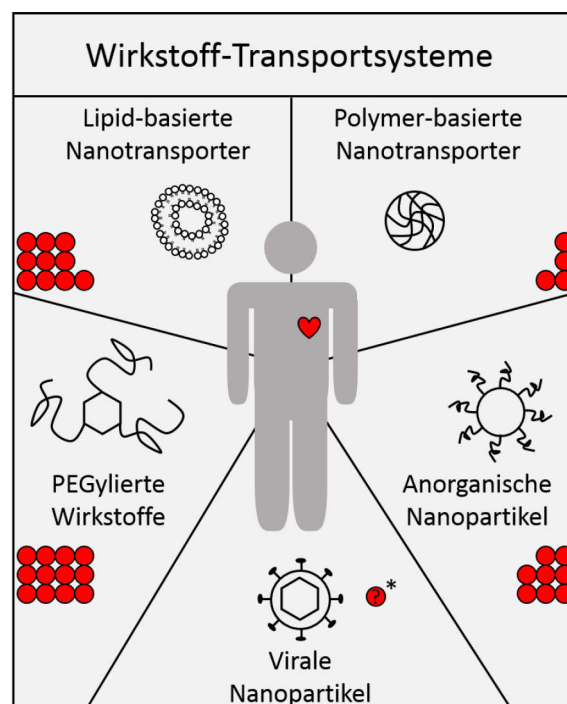


Abbildung 2. Darstellung verschiedener Wirkstofftransportsysteme für niedermolekulare Wirkstoffe und Biopharmazeutika und deren Häufigkeit (rote Kugeln) bei Suche nach „Nanobasierten Medikamenten“ in der Datenbank der FDA. * = unbekannt.

Abbildung 2 zeigt eine Auswahl verschiedener Transportsysteme, welche in Wirkstoffformulierungen Anwendung finden.³¹ Auch wenn ein genauer Prozentsatz der angewendeten DDS nicht ermittelbar ist, wird angenommen, dass bereits ein signifikanter Teil (> 6 %) der zugelassenen Systeme mit einem DDS ausgestattet ist; mit einer steigenden Tendenz.³³⁻

³⁴

Die wohl gängigsten Transportsysteme bilden dabei neben der PEGylierung von Wirkstoffen, also der kovalenten Bindung von Polyethylenglykol (PEG, oder auch Polyethylenoxid, PEO), die lipid- und polymerbasierten Nanotransporter, doch auch andere Systeme, wie anorganische oder virale Nanopartikel finden Anwendungen als DDS in bereits zugelassenen Systemen.³⁵ Die Transportsysteme sollen dabei möglichst keine negativen Auswirkungen auf den Körper haben und in möglichst geringen Mengen verwendet werden, um Nebeneffekte zu vermeiden. So zeigte sich z. B. in Langzeitstudien, dass die Anwendung von Paclitaxel, einem Krebsmedikament, aufgrund des hohen Anteils an DDS häufig zu Überempfindlichkeiten führte.³⁶ Hierbei beträgt der Anteil des Löslichkeitsmittlers Kolliphor EL am Gesamtsystem circa 52 Gew. %, wohingegen der Anteil des Wirkstoffes Taxol im Ethanol-basierten Medikament nur 0.6 Gew. % beträgt.³⁷ Durch die Wahl von humanem Serumalbumin als DDS (nab-Paclitaxel), konnte die Wirkstoffkonzentration auf 10 Gew. % erhöht werden, womit in der Anwendung deutlich weniger Nebenwirkungen beobachtet wurden.³⁸

Ebenfalls finden lipidbasierte Nanotransporter Einsatz für den Transport von Taxol und liefern vielversprechende Ergebnisse.³⁹⁻⁴⁰ Dies verdeutlicht die Signifikanz der Transportsysteme für erfolgreiche Behandlungen und deren komplexe Einflüsse auf Wirkmechanismen. Es gilt daher für die entsprechende Anwendung das passende DDS zu identifizieren.

2.2.1 Lipid- und polymerbasierte Transportsysteme

Lipidbasierte Systeme und im Besonderen Liposome eignen sich zum Transport verschiedenster Wirkstoffe und werden bereits zahlreich in Formulierungen für orale, aber auch intravenöse Anwendungen eingesetzt. Liposome bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht, welche aufgrund der Amphiphilie einen wässrigen Kern von der äu-

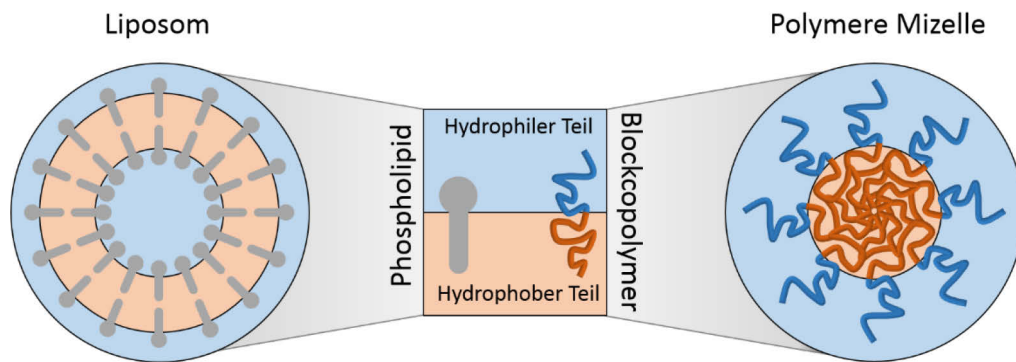


Abbildung 3. Darstellung der *Drug Delivery Systeme (DDS)* Liposom und polymere Mizelle. Orange hinterlegte Bereiche kennzeichnen Orte für eine hydrophobe Wirkstoffspeicherung.

ßeren wässrigen Phase abtrennt. Das Innere der Lipiddoppelschicht bildet dabei eine hydrophobe Schicht aus, die aus einer Vielzahl aliphatischer Kohlenwasserstoffketten besteht (Abbildung 3). Somit können im Inneren hydrophile Wirkstoffe und in der Phospholipid-Membran lipophile/hydrophobe Wirkstoffe eingelagert werden. Liposome sind weitestgehend biokompatibel und besitzen eine geringe Toxizität. Aufgrund der zellmembranähnlichen chemischen Eigenschaften können Liposome leicht mit der Zellmembran verschmelzen und den Inhalt in das Zellinnere entlassen. Nach erfolgter Zellaufnahme können die Liposome abgebaut werden, womit das Transportsystem keine weiteren unerwünschten Nebeneffekte aufweist. Dies ist jedoch gleichzeitig ein Nachteil, da liposomale Nanotransporter schnell vom retikulohistiozytären System (RES) erkannt und aus dem System geschleust werden. Um dies zu vermeiden, werden Liposome oftmals PEGyliert um die Aggregate vor einem Erkennen des Transporters vom Immunsystem zu schützen.⁴¹⁻⁴⁵ Das durch die Polymerisation von Ethylenoxid hergestellte Polymer gilt auf allen Administrationsrouten als weitestgehend nicht-toxisch. Gerade deshalb findet dieses Polymer auch breiten Einsatz in kosmetischen Produkten, wie z. B. Zahnpasta, in welchen ein PEG-Anteil von 10 % erreicht werden kann.⁴⁶ Besondere Beachtung findet PEG als Bestandteil der Nanotransporter wegen des sogenannten Tarnkappeneffekts. Die Adsorptionen von Proteinen aus physiologischen Flüssigkeiten an Nanotransporter führen oftmals zur Ausbildung einer Proteinhülle, die zu einer schnellen Erkennung und Ausscheidung der Transportsysteme durch das RES führen.⁴⁷⁻⁴⁸ Werden Nanotransporter hingegen PEGyliert, werden nicht-spezifische Interaktionen mit Proteinen unterdrückt, was sich in

verlängerten biologischen Halbwertszeiten und verringerten unspezifischen Zellaufnahmen äußert.⁴⁹⁻⁵⁰ Dieser Effekt wird üblicherweise durch den hohen Hydrationsgrad des Polyetherrückgrats erklärt, der durch sterische Abschirmung Proteinadsorptionen verhindert.⁵¹⁻⁵² Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieses Mechanismus ist das Zytostatikum Caelyx®, bei dem Doxorubicin in PEGylierten Liposomen in Tumore transportiert werden soll. Dabei konnten die Zirkulationszeiten des Wirkstoffes durch PEGylierung der Liposome deutlich erhöht und eine Anreicherung des Wirkstoffes durch Abbau der Liposome in den Tumoren erreicht werden. Gleichzeitig wurden Nebenwirkungen wie die Kardiotoxizität des Doxorubicin reduziert.⁵³ Auch wenn Liposome gerade in der biologischen Anwendung kaum Nebenwirkungen zeigen, weisen sie wegen des begrenzten Raumes in der Lipiddoppelschicht geringe Beladungsgrade – das Verhältnis von Wirkstoff zu Transporter – für hydrophobe Wirkstoffe auf.

Polymerbasierte Transportsysteme können durch die Ausbildung eines hydrophoben Kerns die Aufnahme von hydrophoben Wirkstoffen deutlich verbessern. Ein Spezialfall bilden die polymerbasierten Mizellen, die aus amphiphilen Blockcopolymeren gebildet werden. Die Größenverteilungen dieser Mizellen, die durch eine einzigartige Kern-Hülle-Architektur charakterisiert werden, können dabei genau eingestellt werden, was besonders für die spätere Zellaufnahme wichtig ist.⁵⁴⁻⁵⁵ Die Bildung von Mizellen in wässriger Lösung kann dabei auf verschiedenen Kernbildungsmechanismen beruhen: Hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Interaktionen, Metallkomplexierung und Wasserstoffbrückenbindungen.⁵⁶⁻⁵⁷ Polymerbasierte Mizellen können üblicherweise eine erstaunlich geringe kritische Mizellenkonzentration aufweisen, die oft bis zu drei Zehnerpotenzen unterhalb der Phospholipide liegen kann, womit polymerbasierte Mizellen eine gute Stabilität gegen Verdünnung aufweisen.⁵⁸⁻⁶⁰ Ebenfalls lassen sich die Außenhüllen der Mizellen nachträglich auf Basis von einfachen Kupplungsreaktionen funktionalisieren. So wurde z. B. 2017 von ANRAKU *et al.* ein selbst-organisierender, supramolekularer, polymerbasierte Nanotransporter erfolgreich durch die Blut-Hirn-Schranke geschleust.⁶¹ Hierbei wurde die auf PEG basierende Außenhülle des Nanotransporters mit Glukose modifiziert, womit der Komplex über den Glukosetransporter-1 in das Gehirn eingeschleust werden

konnte. Dies ist besonders bemerkenswert, wenn bedacht wird, dass die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke normalerweise auf hydrophobe Moleküle mit einem Molekulargewicht < 450 Da beschränkt ist.⁶² Das hier beschriebene System übertrifft diese Größenordnung um ein Vielfaches. Der funktionalisierte Nanotransporter ist zudem ein gutes Beispiel für das sogenannte Wirkstoff-*Targeting*, dem zielgerichtet ablaufenden Wirkstofftransport zu einem definierten Zielort, um Wirkstoffanreicherung zu realisieren.

2.2.2 Zielgerichteter Wirkstofftransport

Das Konzept des zielgerichteten Wirkstofftransport wurde bereits um 1980 eingeführt und findet seitdem breite Anwendung in der Medikamentenentwicklung.⁶³ Dabei ist das passive *Targeting* bei z. B. der Krebsbehandlung ein gern genutzter Therapieansatz. Aufgrund der Neovaskularisierung in Tumoren wird deren Nährstoffversorgung erhöht, wobei durch Mängel in der vaskulären Struktur auch fremde Substanzen eingeschleust werden (EPR-Effekt, *Enhanced Permeability and Retention*, erhöhte Permeabilität und Retention).⁶⁴ Somit kann eine Anreicherung von zytotoxischen Medikamenten in Krebszellen erreicht werden, ohne dass es zu einer vermehrten Anreicherung und einem damit verbundenen Zellsterben in gesunden Zellen kommt. Aber auch aktives *Targeting* kann erfolgreich bei der Behandlung von Krebs umgesetzt werden.⁶⁵ Ein Beispiel hierfür ist der 2018 in Europa zugelassene Arzneistoff Gemtuzumab-Ozogamicin, ein Antikörperkonjugat (ADC, *Antibody-Drug-Conjugate*), welches bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie, einer malignen Erkrankung des blutbildenden Systems, verwendet wird. Der Wirkstoff besteht aus einem humanisierten monoklonalen Antikörper, der mit einem bakteriellen Toxin verbunden ist. Beim aktiven *Targeting* bindet der Antikörper spezifisch an die CD33-Antigene, welche an der Zelloberfläche der erkrankten leukämischen Blasten präsentiert werden und bindet diese. Durch die Bindung kann ein Komplex entstehen, der in die Zellen geschleust wird und dort das Toxin freisetzt, was in einem Absterben der CD33-exprimierenden Zellen resultiert.⁶⁶

Doch auch die Modifikation von polymerbasierten Transportern mit Antikörpern, sogenannten Immuno-Mizellen, wurde erfolgreich umgesetzt. Diese haben im Gegensatz zu den ADCs höhere Wirkstoffbeladungsgrade, womit die Menge an eingeschleustem Wirkstoff effektiv erhöht werden kann. Ein Beispiel für Immuno-Mizellen sind mit Paclitaxel-

beladene anti-HER2 Immuno-Nanopartikel. Diese auf Polylactiden bestehenden Nanopartikel sind an der Oberfläche mit dem monoklonalen Antikörper anti-HER2 modifiziert und binden den entsprechenden Wachstumsfaktor-Rezeptor, welcher im Frühstadium von Krebs amplifiziert wird. Durch die Bindung können die Nanopartikel aufgenommen und der Wirkstoff freigesetzt werden.⁶⁷⁻⁶⁸ Somit wird ein Einschleusen des Wirkstoffes in gesunde Zellen unterbunden, was sich in geringeren Nebenwirkungen äußert.

Oftmals weisen die Nanotransporter jedoch ein gemeinsames Problem auf: Die Bindungen der Wirkstoffe im hydrophoben Kern basieren auf unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen, womit eine Wirkstoffselektivität der Nanotransporter praktisch nicht vorhanden ist. Dies kann in schwer kontrollierbaren, pharmakologischen Profilen der Systeme resultieren. Interessanterweise bietet gerade die Natur eine breite Palette verschiedener Naturstoffe mit spezifischen Wechselwirkungen, wie z. B. Transportproteine oder Peptide, welche Stoffe substratspezifisch hoch selektiv binden können.⁶⁹⁻⁷⁰ Wird dieses Konzept auf die Blockcopolymere angewendet, können Wirkstofftransporter etabliert werden, die Wirkstoffe selektiv binden und transportieren.

2.2.3 Peptid-Polymer-Konjugate als Wirkstofftransporter

Ein Beispiel für selektiv bindende Blockcopolymere sind Peptid-Polymer-Konjugate. In diesen werden synthetische, hydrophile Polymere mit Peptiden verknüpft, welche über verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen Wirkstoffe binden. Peptide können, im Gegensatz zu den meisten synthetischen Polymeren, sequenzkontrolliert aus den entsprechenden Aminosäuren hergestellt werden und somit genau auf die Bindung bestimmter Zielmoleküle zugeschnitten werden.⁷¹ Im menschlichen Körper gibt es eine Reihe an Beispielen für hoch selektiv bindende Transportproteine, wie z. B. die Globine, welche in Lebewesen den Sauerstofftransport übernehmen oder auch Lipoproteine, die wasserunlösliche Substanzen wie Cholesterin, Triglyceride, Fettsäuren und Phospholipide spezifisch bindet und transportiert. Auch der Transport der niedermolekularen Verbindungen Vitamin E ($M = 430.7 \text{ g/mol}$) und Vitamin A ($M \approx 300 \text{ g/mol}$) wird von den Lipoproteinen übernommen. Der Transport von niedermolekularen Vitamin-D-Metaboliten erfolgt über eine spezifische Bindung durch das Vitamin-D bindende Protein (DBP).

Somit ist der Ansatz der Bindung von Wirkstoffen mittels maßgeschneiderter Peptide erfolgsversprechend.⁷²⁻⁷³

Zur Löslichkeitsvermittlung muss auf eine Kupplungsstrategie des wirkstoffbindenden Peptids mit einem hydrophilen Polymer zurückgegriffen werden. Das wohl bekannteste Polymer ist dabei das bereits erwähnte PEG. Es können jedoch auch andere hydrophile Polymere wie z. B. Polysarkosin, ein Polypeptoid basierend auf *N*-Methylglycin, Dextrine oder auch Polyphosphoester für Löslichkeitsvermittlung verwendet werden, welche teilweise ebenfalls gute Tarnkappeneffekte aufweisen.⁷⁴⁻⁷⁷ Die Synthese der Peptid-PEG-Konjugate erfolgt über den schrittweisen Aufbau einer Peptidsequenz an einem mit PEG vorbeladenen Syntheseharz, welches prinzipiell über zwei unterschiedliche Wege hergestellt werden kann: Durch Kupplung von bereits polymerisiertem PEG an das Syntheseharz oder durch direkte Polymerisierung von Ethylenoxid am Syntheseharz (*grafting*). Die erste Methode basiert auf einer klassischen Ethersynthese, bei der eine der beiden terminalen Hydroxylgruppen des PEGs mit einem chloromethylierten Polystyrolharz reagiert. Dabei kann es jedoch gerade bei längeren PEGs mit Massen > 800 Da zu unzureichenden Kupplungsausbeuten und zur Bildung von cyclischen Spezies kommen, wodurch die Kapazität des Harzes reduziert wird. In der zweiten Methode wird daher Ethylenoxid direkt durch eine anionische Polymerisation unter Verwendung eines alkalischen Katalysators am Syntheseharz polymerisiert. Dabei können PEG-Ketten mit Massen > 20 kDa und geringer Polydispersität $\bar{D} \approx 1.04$ (Polydispersitätsindex, PDI) realisiert werden.⁷⁸⁻⁸⁰ Die Kupplung der Peptidsequenzen kann anschließend über die von dem Nobelpreisträger MERRIFIELD im Jahre 1963 eingeführte Festphasen-Peptidsynthese durchgeführt werden.⁸¹ Bei dieser wird die Peptidsequenz an einer Festphase in Richtung C- zu N-Terminus aus den entsprechenden Aminosäuren schrittweise aufgebaut. Diese Synthese kann vollständig automatisiert durchgeführt werden und verläuft mit annähernd quantitativen Kupplungsausbeuten.⁸² Nach vollständiger Synthese der Peptidsequenz kann diese durch eine geeignete Linkerstrategie als Peptid-PEG-Konjugat von der Festphase abgespalten werden.

In den letzten Jahren konnten in der Arbeitsgruppe um Prof. BÖRNER bereits einige Peptid-PEG-Konjugate realisiert werden, die sequenzspezifisch mit verschiedensten Substraten interagieren. Dabei beschränkten sich die Einsatzmöglichkeiten der Peptid-PEG-Konjugate nicht nur auf die Solubilisierung hydrophober Wirkstoffe, sondern finden auch in Oberflächenbeschichtungen wie z. B. Antifouling-Beschichtungen oder Kompositmaterialien Einsatz.⁸³⁻⁸⁷ In diesen Systemen konnten die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Materialien maßgeschneidert eingestellt werden. Bei der Entwicklung spezifischer Binder für Wirkstoffe standen der bereits zugelassene Krebswirkstoff *m*-THPC und potentielle ALZHEIMER-Wirkstoffe im Fokus, die durch eine geringe intrinsische Wasserlöslichkeit eine reduzierte Bioverfügbarkeit aufweisen. Durch Einsatz von spezifisch bindenden Konjugaten konnten diese Wirkstoffe erfolgreich solubilisiert und transportiert werden.^{4,88-93} Die amphiphilen Peptid-PEG-Konjugate bilden dabei in wässrigen Medien Aggregate mit hydrodynamischen Radien von $R_h \leq 100$ nm aus, in deren Kern der Wirkstoff gelagert wird. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Freisetzungen der Wirkstoffe aus den Aggregaten gelegt, die mittels vereinfachtem Blutplasmamodell getestet wurden. Dabei zeigten die Peptid-PEG-Konjugate im Vergleich zu klassischen Löslichkeitsvermittlern wie z. B. Tensiden schnelle Freisetzungskinetiken, womit sich diese Systeme für Anwendungen mit einer hohen Transsolubilisierungsrate eignen.

Auch wurden schaltbare Transporter realisiert, die durch externe Stimuli gezielt Wirkstoff freisetzen und somit dem aktiven *Targeting* zugeordnet werden können.⁸⁹ Hierbei wurden Disulfidbrücken in die Peptidsequenzen eingebaut, die in einem reduktiven Medium von z. B. Krebszellen gespalten werden können und durch die damit einhergehende Zerstörung des Bindemotivs den Wirkstoff gezielt freisetzen. Interessanterweise beruhten die Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten der Peptidsequenzen mit den Wirkstoffen nicht ausschließlich auf simplen hydrophoben, sondern auf einer Kombination aus polaren, ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen. So konnten Sequenzabhängigkeiten der Bindungen festgestellt werden, die auf einen komplexen Bindemechanismus hinweisen. In ersten zellbasierten Experimenten wurden zudem gute Zellaufnahmen und Aktivitäten der Systeme beobachtet, weshalb die Peptid-Polymer-Konjugate als vielversprechendes DDS angesehen werden können.

2.2.4 Screening-Methode zu Identifizierung von Bindern

Die Auswahl der wirkstoffbindenden Peptidsequenzen wurde über Screenings gegen Peptidbibliotheken realisiert.⁹⁴ Diese bestehen aus einer großen Anzahl an Syntheseharzpartikel, deren Oberflächen mit randomisierten Peptidsequenzen modifiziert sind. Die Synthese dieser Peptidbibliotheken erfolgt über einen *Split&Mix*-Ansatz (aus dem Englischen: Teilen und Durchmischen), der eine abgewandelte Form der von MERRIFIELD eingeführten Festphasenpeptidsynthese darstellt (Abbildung 4). Dabei wird in einem ersten Schritt ein Fmoc-entschütztes Syntheseharz in Aliquote aufgeteilt (*Split*) und jedes Aliquot mittels Festphasenpeptidsynthese mit einer anderen Aminosäure gekuppelt. Anschließend werden die verschiedenen Aliquote wieder vereint und durchmischt (*Mix*) und die temporären Schutzgruppen entfernt. Diese Schritte werden wiederholt, bis die erwünschte Länge der Bibliothek erreicht ist. Die finale Bibliothek besteht damit aus einer Vielzahl an Syntheseharzpartikeln, die nur Kopien derselben Sequenz auf der entsprechenden Oberfläche tragen. Die Anzahl der theoretisch möglichen Peptidsequenzen steigt dabei exponentiell mit der Anzahl der *Split&Mix*-Durchgänge. Während bei einer 5mer-Bibliothek mit sieben verschiedenen Aminosäuren theoretisch ca. 17 000 Kombinationen (7^5) möglich sind, sind es bei einer entsprechenden 7mer Bibliothek bereits ca. 823 000 Kombinationen (7^7).

Um diese Bibliotheken auf spezifische Peptidinteraktionen mit den Wirkstoffen zu untersuchen, wurden die wasserunlöslichen Wirkstoffe in einem geeigneten Lösemittel (z. B. DMSO oder Ethanol) gelöst und mit den Peptidbibliotheken inkubiert (Abbildung 5). Wirkstoffanreicherungen an gut bindenden Harzpartikeln konnten aufgrund der spezifi-

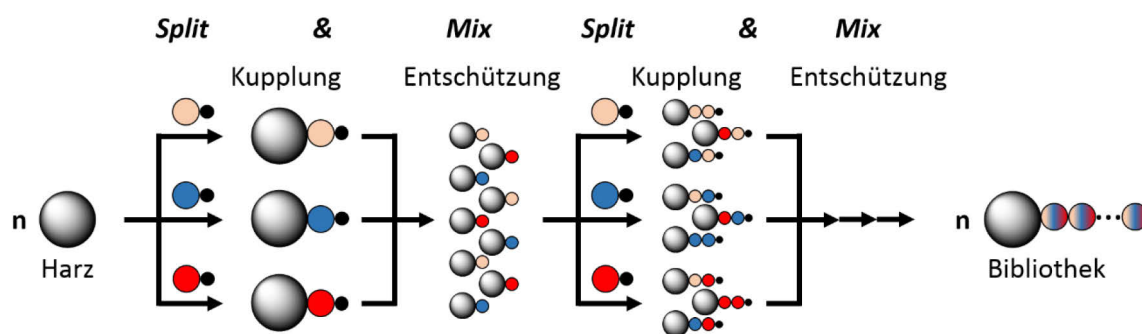


Abbildung 4. Generelles Schema zur Synthese einer Peptidbibliothek durch *Split&Mix*.

schen Eigenschaften der Wirkstoffe durch Fluoreszenz- bzw. Raman-Mikroskopie detektiert werden. Die mit stark bindenden Peptiden modifizierten Festphasen wurden anschließend manuell separiert und die Peptide von der Festphase abgespalten. Mithilfe einer Sequenzierung mittels MALDI-ToF-MS² (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeit-Tandem-Massenspektrometrie) wurden die Peptidsequenzen entschlüsselt und Bindungsmotive identifiziert. Diese wurden anschließend als Peptid-PEG-Konjugate synthetisiert und auf Wirkstoffaufnahme-fähigkeit getestet und optimiert. Aufgrund der Beschaffenheit des Screenings können jedoch keine direkten Wirkstofffreisetzungseigenschaften der Peptide bestimmt werden, weshalb diese in separaten Experimenten ermittelt werden müssen.

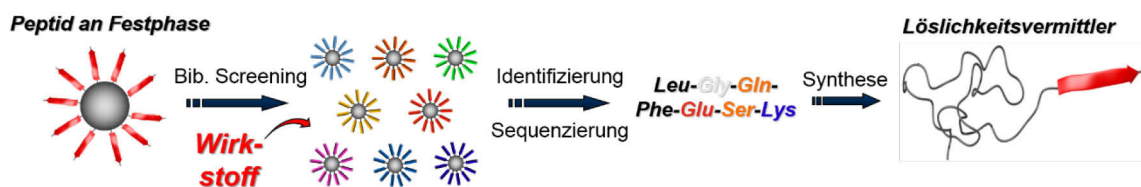


Abbildung 5. Identifizierung von spezifisch bindenden Peptid-Polymer-Konjugaten mittels Screening gegen Peptidbibliotheken.

Ein weiterer, moderner Ansatz ist die Nutzung des Phagendisplays, welches besonders bei der Identifizierung von spezifisch bindenden Peptiden für Nanopartikel oder auch Nanomaterialien genutzt wird. Dazu werden große, rekombinante Phagenbibliotheken genutzt, in denen die einzelnen Phagen verschiedene Peptide präsentieren. So konnten bereits spezifisch bindende Peptide für Gadoliniumoxid-Nanopartikel, einem Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie, identifiziert werden, die als Teil von Peptid-Polymer-Konjugaten in der Lage waren die Nanopartikel abzuschirmen.⁹⁵ Auch konnten Binder für diverse Oberfläche identifiziert werden, z. B. Aluminiumoxid- Cellulose- oder Magnesiumfluorid-Oberflächen.^{83-84,87,96} Das Phagendisplay setzt jedoch voraus, dass das Zielmolekül während des Screenings immobilisiert ist. Dies ist bei der Wirkstoffforschung nur bedingt möglich, da das Zielmolekül dafür chemisch modifiziert werden müsste und Interaktionen mit Peptiden nicht mehr nur auf reine Wirkstoff/Peptid-Wechselwirkung zurückzuführen sind.

2.3 Demenzerkrankungen

Interessante Gebiete für einen gezielten Wirkstofftransport sind die Volkskrankheiten wie z. B. Diabetes, Krebs oder auch Demenzerkrankungen. Während es für eine Reihe an Krebserkrankungen bereits Medikamente gibt und auch für Diabetes Behandlungsmöglichkeiten verfügbar sind, die ein Leben mit hoher Lebensqualität ermöglichen, gibt es für Demenzerkrankungen momentan wenige Behandlungsmöglichkeiten. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und ALZHEIMER's Disease International leiden momentan weltweit circa 47 Millionen Menschen an einer Demenzerkrankung – davon alleine 1.7 Millionen in Deutschland.⁹⁷⁻⁹⁸ Weltweit erkranken zudem jährlich ca. 9.9 Millionen Menschen an einer Demenz, womit sich die Zahl der Betroffenen im Jahre 2050 auf ca. 152 Millionen prognostizieren lässt. Die Kosten für die Behandlung und Pflege der Betroffenen belaufen sich 2018 auf circa 1 Billionen US\$ und werden sich bis 2030 verdoppeln (Abbildung 6). Dabei sind in den Kosten auch sogenannte informelle Pflegekräfte eingeschlossen, wie z. B. Ehepartner oder Kinder, die sich mit der Pflege der Ehepartner bzw. Eltern konfrontiert sehen. Alleine die Einsatzzeit dieser Pflegekräfte wird weltweit auf ca. 82 Milliarden Stunden geschätzt. Somit ist der Markt für ein wirksames Medikament vielversprechend. Das Risiko an einer Demenz zu erkranken ist dabei keineswegs

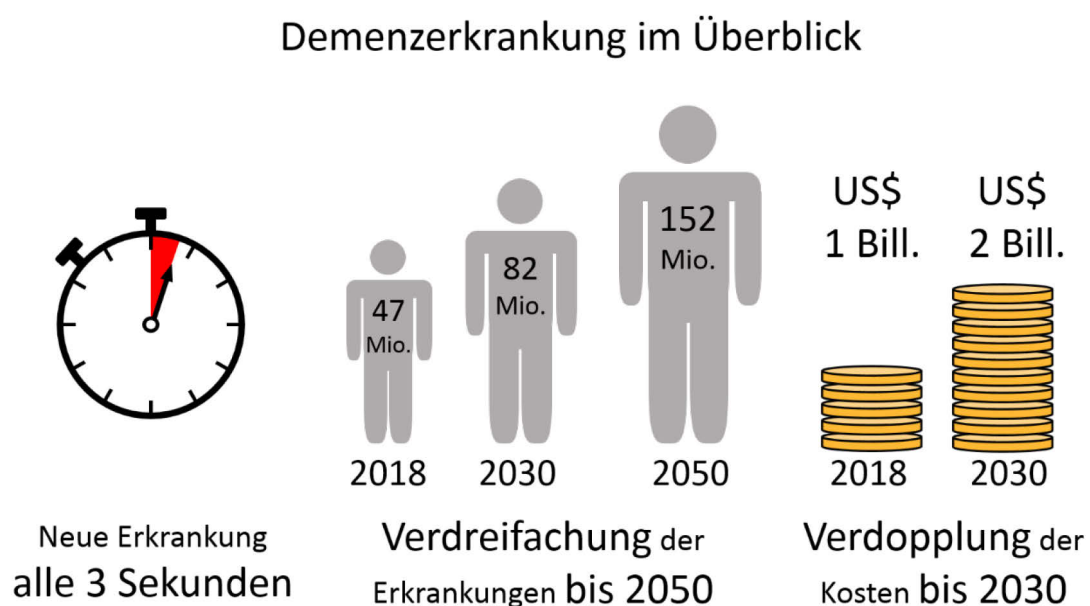


Abbildung 6. Demenz-Neuerkrankungen, Krankheitsentwicklung und Kosten der Pflege und Behandlung weltweit im Überblick. Bill. = Billionen, 1 \$ \triangleq 0.86 €.

gleichmäßig über die Bevölkerungsgruppen verteilt. So nimmt das Risiko einer Erkrankung ab einem Alter von 65 Jahren rapide zu und auch das Geschlecht scheint eine entscheidende Rolle zu spielen: Circa 2/3 der Demenzerkrankungen entfallen auf Frauen, 1/3 auf Männer. Die Ursachen lassen sich dabei nicht nur mit der erhöhten Lebenserwartung von Frauen erklären, sondern müssen auch auf andere Effekte zurückzuführen sein, welche jedoch noch unzureichend erforscht sind.

65 % aller Demenzerkrankungen lassen sich der Gruppe der ALZHEIMER-Erkrankung zuordnen, gefolgt von der vaskulären Demenz (15 %) und Mischformen (15 %). Die restlichen 5 % entfallen auf andere Formen wie z. B. das KORSAKOW-Syndrom, welches durch Alkoholmissbrauch ausgelöst werden kann.⁹⁹ Dabei weisen alle das Leitsymptom der Gedächtnisstörung auf, die sich im Anfangsstadium der Krankheit vorrangig auf das Kurzzeitgedächtnis auswirkt, im weiteren Verlauf jedoch ebenfalls auf das Langzeitgedächtnis übergehen kann. Dies kann in einer Störung der kortikalen Funktionen resultieren, die sich durch den Verlust von erworbenen Kenntnissen wie z. B. Rechnen, Sprechen oder Orientierung äußert. Aufgrund der hohen Prävalenzen und Kosten der ALZHEIMER-Erkrankungen wird in den USA laut Gesundheitsministerium 2018 die ALZHEIMER-Forschung mit circa 1.8 Milliarden US\$ unterstützt; eine dreifache Steigerung gegenüber 2014. Damit liegt die Unterstützung zwar noch weit unterhalb der Krebsforschung (6.6 Milliarden US\$), zeigt jedoch das gestiegene Bewusstsein für diese Erkrankungen.¹⁰⁰

2.3.1 Grundlagen der ALZHEIMER-Erkrankung

Es ist inzwischen bekannt, dass dem Auftreten erster Symptome ALZHEIMER-Erkrankung eine 20 – 30 Jahre andauernde präsymptomatische Phase vorangeht.¹⁰¹ In dieser Zeit kommt es zu pathologischen Ablagerungen von β -Amyloid ($A\beta$) als amyloide Plaques zwischen den Neuronen im Gehirn und zur Ausbildung von Tau-Fibrillen innerhalb der Neuronen. $A\beta$ ist das Fragment des integralen Membranproteins APP (Amyloid-Vorläuferprotein) und entsteht als Nebenprodukt bei dessen katabolischem Abbau. In gesunden Gehirnen wird dieses Nebenprodukt zersetzt und vernichtet, bei der ALZHEIMER-Erkrankung sammeln es sich jedoch zu harten, wasserunlöslichen Plaques an. Diese Plaques können neurotoxisch wirken und die synaptischen Funktionen stören.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Dabei

bleibt der genaue Mechanismus der A β -induzierten Zytotoxizität ungeklärt, jedoch wurden einige Hypothesen aufgestellt: So könnte oxidativer Stress, die Entstehung von freien Radikalen oder eine erhöhte Calciumaufnahme durch vermehrte Bindung des Neurotransmitters Glutamat an den entsprechenden Rezeptoren den Zelltod herbeiführen.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Die Plaques treten hauptsächlich im Neocortex, Hippocampus und in anderen, für kognitive Funktionen zuständige, subkortikalen Regionen auf und sorgen damit für Gedächtnisschwund. A β wird in der Literatur als Nebenprodukt ohne relevante physiologische Eigenschaften beschrieben. Jedoch zeigen neue Studien, dass A β als antimikrobielles Peptid fungiert und damit durchaus wichtige Rollen im Gehirn übernimmt, was bei einer Behandlung der Krankheit beachtet werden muss.^{104,109} Weiterhin wurde 2015 das η -Amyloid (A η) identifiziert, welches, ähnlich wie A β , ein Spaltprodukt des APP ist und mit A β im Gleichgewicht steht. Bei einer Blockierung der β -Sekretasen durch Medikamente, also der Unterdrückung der A β -Bildung, kann es daher zu einem Ungleichgewicht zwischen A β und A η kommen, welches unerwünschte Nebeneffekte verursacht.¹¹⁰

Neben diesen vorrangig extrazellulär vorkommenden Ablagerungen kann es aber auch innerhalb der Zellen zu Aggregatbildungen kommen. Im Vordergrund steht dabei das Tauprotein, welches in Neuronen das wichtigste Mikrotubulus assoziierte Protein darstellt.¹¹¹⁻¹¹² Die physiologische Funktion des höchst wasserlöslichen Tauproteins ist es, die axonalen Mikrotubuli zu stabilisieren und den axonalen Transport von Vesikeln und Organellen zur Synapse zu gewährleisten. Bei der ALZHEIMER-Krankheit wird das Tauprotein von hyperaktiven Enzymen wie z. B. der Proteinkinase MARK hyperphosphoryliert, wodurch sich das Protein vom Mikrotubulus löst und neurofibrilläre, intrazelluläre Aggregate bildet.¹¹³⁻¹¹⁵ In gesunden Neuronen ist der Phosphorylierungsgrad reguliert und beträgt circa zwei Phosphate pro Tauprotein,¹¹⁶ bei ALZHEIMER steigt dieser Wert jedoch auf circa acht Phosphate pro Molekül, wobei der Wert aufgrund von Dephosphorylierung nach dem Tod sogar noch höher liegen kann.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Es wird angenommen, dass der hohe Phosphorylierungsgrad ein Haupttreiber der Tau-Aggregation ist, jedoch ist der genaue Mechanismus ungeklärt. Eine wichtige Rolle könnten dabei polyanionische Kofaktoren spielen: Diese sind in der Lage in *in vitro* Experimenten Tau zu aggregieren; unabhängig von dessen Phosphorylierungsgrad.¹¹⁹⁻¹²⁰ Auch wenn die genauen Zusammenhänge der

Tau-Phosphorylierung und -Aggregation weiterhin ungeklärt bleiben gilt es als unbestritten, dass die Aggregation zu einer Reduzierung der löslichen Taufraktion in den Neuronen führt. Dies kann nicht nur in einer Auflösung der Mikrotubuli resultieren, sondern auch den Eisentransport, die Neurogenese und den DNA-Schutz negativ beeinflussen.¹²¹⁻

¹²³ Die Untersuchung der genauen Zusammenhänge dieser beiden Aggregationen steht momentan im Fokus der Forschung: So konnte bereits ein Mechanismus identifiziert werden, der A β -Ablagerungen mit Tauaggregation verknüpft. Durch die erhöhte Calciumaufnahme nach A β -Oligomerbildung kann es zu einer Erhöhung der Kinaseaktivitäten kommen, die die Haupttreiber für die Hyperphosphorylierung des Tauproteins sind.¹²⁴

Somit würde die Tauaggregation in diesem Modell eine A β -Aggregation voraussetzen.¹²⁵⁻

¹²⁶

2.3.2 Behandlung der ALZHEIMER-Krankheit

Bis heute ist es nicht gelungen, ein Heilmittel für ALZHEIMER zu finden.¹²⁷ Sobald eine Person Anzeichen einer ALZHEIMER-Erkrankung aufweist, z. B. Gedächtnisverlust oder Schwierigkeiten beim Lernen und im täglichen Leben, gibt es keine Behandlungsmöglichkeiten, die diese Erscheinungen rückgängig machen. Dennoch gibt es einige symptomatische Medikamente, welche die beschriebenen Beschwerden lindern und die Lebensqualität der Patienten verbessern.

In Europa und den USA sind momentan zwei Arzneimittelklassen zugelassen: Die Acetylcholinesterase-Hemmer und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonisten.¹²⁸⁻¹³¹ Acetylcholin (ACh) ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im menschlichen Organismus und ist besonders bei kognitiven Prozessen als Botenstoff eingebunden. Kommt es nun, wie bei der ALZHEIMER-Krankheit beobachtet, zu einem vermehrten Absterben von ACh produzierenden Nervenzellen, verringert sich dessen Konzentration und sorgt damit für unvollständige Signalübertragungen. Dieser Mangel kann jedoch teilweise durch die Hemmung der Acetylcholinesterasen ausgeglichen werden: Diese sorgen im gesunden Gehirn durch Abbau von ACh für eine Regulierung der ACh-Konzentration. Durch eine Blockierung dieser Esterasen steigt die ACh-Konzentration wieder an und

lässt die Signalübertragung vollständig ablaufen.¹³²⁻¹³³ Leider weist diese Medikamentenklasse eine Vielzahl von Nebenwirkungen auf, wie z. B. Schwindel und Übelkeit.¹³⁴

Während Acetylcholinesterase-Hemmer nur symptomatisch wirken, können die NMDA-Rezeptor-Antagonisten den Krankheitsverlauf effektiv hinauszögern. An ALZHEIMER erkrankte Zellen produzieren eine erhöhte Menge des Neurotransmitters Glutamat, welcher an die NMDA-Rezeptoren gesunder Zellen bindet und zu einer Öffnung der Calcium-Ionenkanäle führt. Wie bereits beschrieben kann dies zu einem beschleunigten Zelltod führen. Die Antagonisten, hauptsächlich Memantin, binden an die Rezeptoren und vermeiden damit ein Öffnen der Ionenkanäle, was sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken kann.¹³⁵

Die Entwicklung neuer ALZHEIMER-Medikamente ist von Misserfolgen geprägt: So schlugen zwischen 2002 – 2012 ca. 99.6 % aller klinischen Forschungen fehl.¹³⁶ Jedoch befinden sich momentan 21 neue Medikamente in klinischen Studien. Ein neuartiger Ansatz sind dabei monoklonale Antikörper gegen A β , die sich an das A β -Protein heften und dem Immunsystem ein Signal zum Abbau bieten. Dieser Ansatz wird deshalb auch „passive Immunisierung gegen ALZHEIMER“ genannt.¹³⁷⁻¹³⁹ Auch A β -Sekretase-Inhibitoren werden gegen A β -Ablagerungen eingesetzt. Sie verstärken nicht deren Abbau, sondern sorgen durch Blockierung der Sekretase dafür, dass kein neues A β mehr gebildet werden kann.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ Da momentan jedoch nicht eindeutig geklärt ist, ob Tau- oder A β -Ablagerungen die hauptsächliche Neurotoxizität auslösen, werden auch Wirkstoffe gegen Tau-Fibrillen entwickelt.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Eine spezielle Klasse sind dabei die auf einem Rhodaninkern basierenden Wirkstoffe.^{3,145-146}

2.3.3 Rhodanin-basierte Wirkstoffe

Rhodanine (2-Thioxothiazolidin-4-on) wurden in Hochdurchsatz-Screenings als potentielle Tau-Aggregationsinhibitoren identifiziert (Abbildung 7).³ Sie werden generell als nicht-mutagen klassifiziert und eignen sich daher für den Einsatz als Arzneimittel. Weiterhin wurden bereits einzelne Rhodanine, z. B. der Wirkstoff Epalrestat zur Behandlung der diabetischen Neuropathie, in Langzeitstudien als gut verträglich beschrieben.¹⁴⁷⁻

¹⁴⁸ Zur Identifizierung potentieller Wirkstoffe wurde die Leitstruktur (Abbildung 7, b) mit

unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgestattet und die verschiedenen Moleküle in *in vitro* Experimenten überprüft. Dabei standen nicht nur die Inhibierung der Tau-Aggregation, sondern auch die Deaggregation bereits ausgebildeter Tau-Filamente im Vordergrund. In lösemittelbasierten Experimenten wurden IC₅₀- und DC₅₀-Werte (mittlere inhibitorische Konzentration bzw. mittlere Konzentration für eine Deaggregation) im niedrigen mikromolaren Bereich erzielt. Der hier dargestellte reine Wirkstoff BB17 (Abbildung 7, c) erreichte mit IC₅₀ = 540 nM und DC₅₀ = 390 nM sogar Werte im nanomolaren Bereich. Weiterhin konnten in zellbasierten Tests keine Zytotoxizitäten festgestellt werden. BB17 weist jedoch eine geringe intrinsische Wasserlöslichkeit auf, weshalb auf ein geeignetes DDS zurückgegriffen werden muss. Hierzu wurde auf die bereits erwähnte Peptid-PEG-Konjugat Strategie zurückgegriffen (siehe 2.2.3).

In fluoreszenzbasierten Screenings wurden dabei 7mer Peptideinheiten identifiziert, die nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Wirkstoff BB17 ausbilden. Als Teil von Peptid-PEG-Konjugaten konnten diese den Wirkstoff in Form von Aggregaten erfolgreich solubilisieren. Dabei wurden pro 1 mol Peptid-PEG-Konjugat bis zu 0.12 mol Wirkstoff in Lösung gebracht. Mittels dynamischer Lichtstreuung und Kryo-Elektronenmikroskopie wurden den Aggregaten kolloidale Formen mit hydrodynamischen Radien von $R_h = 55 - 71$ nm nachgewiesen und eignen sich damit für einen Einsatz im Körper.¹⁴⁹

In *in vitro* Experimenten wurden IC₅₀-Werte bis zu 0.3 μ M für die mit Wirkstoff beladenen Systeme beobachtet, womit sie sich in der gleichen Größenordnung wie der reine Wirkstoff befinden. Dabei ist jedoch bemerkenswert, dass die Experimente mit den beladenen Aggregaten in wässriger Lösung durchgeführt wurden, wohingegen der reine Wirkstoff

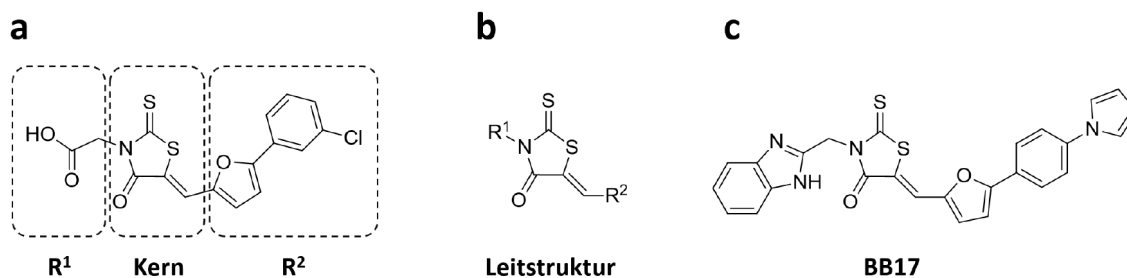


Abbildung 7. Beispiel für einen identifizierten *Hit* im Hochdurchsatz-Screening (**a**), die daraus abgeleitete Leitstruktur auf Basis des Rhodanins (**b**) und der vielversprechende potentielle Wirkstoff **BB17** (**c**).

mit DMSO solubilisiert werden musste. Da DMSO jedoch für eine spätere Anwendung im Körper ungeeignet ist und bei BB17 ohne Formulierungsadditiv keine Wirkung festgestellt werden kann, stellen diese Ergebnisse eine signifikante Verbesserung des Wirkstoffsystems dar. Ebenfalls konnten keine Zytotoxizitäten der Konjugat-Wirkstoff-Komplexe in zellbasierten Experimenten beobachtet werden, weshalb eine Bioanwendung der Peptid-PEG-Systeme im Körper möglich scheint.³⁻⁴

Die zuvor etablierten Screening-Methoden setzen die Selektion von Bindungspeptiden mit hoher Wirkstoffbindungskapazität in den Fokus, womit Wirkstofffreisetzungskinetiken, wie z. B. an Albumine im Blut, nicht berücksichtigt wurden. Für Anwendungen im Körper ist diese Eigenschaft jedoch höchst relevant, da diese z. B. die Verweildauer im Körper oder auch das Erreichen des Zielortes beeinflusst. Eine Weiterentwicklung der Screening-Methode könnte Peptid-PEG-Systeme identifizieren, die klar definierte Beladungs- und Freisetzungseigenschaften aufweisen und somit bessere und einstellbare Wirkstofftransporter realisieren.

3 Ergebnisse und Diskussion

Es konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass Peptid-Polymer-Konjugate geeignet sind um wasserunlösliche, niedermolekulare Wirkstoffe zu solubilisieren.^{90,150} Dabei binden die hydrophoben Zielmoleküle struktur- und sequenzspezifisch an die Peptide und werden durch das hydrophile Polymer in die wässrige Phase gebracht. Die bestehende Screening-Methode zur Identifizierung der wirkstoffbindenden Peptide eignet sich jedoch nur zur Bestimmung von relativen Bindungsaffinitäten.² Wirkstofffreisetzungseigenschaften können nur in aufwändigen Messungen nachträglich bestimmt werden und sind nicht Bestandteil des Selektionsprozesses. Es ist daher hochgradig relevant, eine Screening-Methode zu etablieren, die eine gleichzeitige Bestimmung beider erwähnten Eigenschaften ermöglicht.

Die erweiterte Screening-Methode soll Peptidsequenzen identifizieren, die als Teil von Peptid-Polymer-Konjugaten niedermolekulare Wirkstoffe sowohl gut binden, als auch definiert freisetzen. Die Bindung der Wirkstoffe an die Peptidsequenzen soll dabei auf spezifischen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen basieren. Ebenfalls sollen die Freisetzungseigenschaften auf rein kompetitiven und nicht auf schaltbaren Mechanismen wie z. B. Spaltung der Peptidsequenzen beruhen. Zur Identifizierung solcher Peptidsequenzen soll auf die bereits etablierte Methodik der kombinatorischen Peptidbibliotheken zurückgegriffen werden. Dabei ist es möglich, Wirkstoffe in einem natürlichen, chemisch unmodifizierten Zustand zu untersuchen. Dies hat unter anderem den Vorteil, dass während des Screenings nur Peptid/Wirkstoff Interaktionen beobachtet werden. Damit unterscheidet sich diese Methode maßgeblich von z. B. einem Phagendisplay, bei dessen Screening eine permanente, kovalente Immobilisierung des Wirkstoffes mittels Linkerstrategie nötig wäre.¹⁵¹

Der potentielle ALZHEIMER-Wirkstoff BB17 (Abbildung 7, c) wurde als Zielmolekül ausgewählt, da er ausgeprägte Fluoreszenzeigenschaften aufweist, welche zur Nachverfolgung von Wirkstoffanreicherungen in Harzkügelchen der Peptidbibliotheken genutzt werden können. Dabei liegt das Absorptionsmaximum von BB17 bei 472 nm und das

Emissionsmaximum bei 662 nm, was für eine intensive, gut beobachtbare orangene/rötliche Farbe sorgt.³ Es konnten bereits Peptid-Polymer-Konjugate zur Solubilisierung von BB17 identifiziert werden, die auch in Zelltests vielversprechende Ergebnisse lieferten.^{4,145-146,152} Durch die Weiterentwicklung der Screening-Methode soll hier angeknüpft und die Wirkstofffreisetzung mit definierten Peptid-Polymer-Konjugaten gezielt gesteuert werden.

3.1.1 Konzept einer erweiterten Screening-Methode

Da das Screening auf die Charakterisierung mehrerer Eigenschaften abzielt, ist es notwendig die Bibliothek für die Dauer des Screenings zu immobilisieren (Abbildung 8). Somit kann ein 2-stufiges Screening mit gekoppelter Sequenzierung der Peptide durchgeführt werden. Dabei werden in einem ersten Schritt die Bindungsaffinitäten der Peptidsequenzen und anschließend in einem zweiten Schritt die kompetitiven Freisetzungseigenschaften in Waschexperimenten ermittelt. Dadurch können Wirkstofftransporter identifiziert werden, die in bestimmten Medien Wirkstoff schnell freisetzen, bzw. abschirmen. Anschließend werden die Peptide im immobilisierten Zustand der Festphase abgespalten und direkt mittels MALDI-ToF-MS² sequenziert. Diese *on-chip*-Lösung soll dabei halbautomatisiert durchgeführt werden, was die Handhabung des Screenings erhöht. In anschließenden Tests sollen die ermittelten Eigenschaften dann überprüft und bestätigt werden.

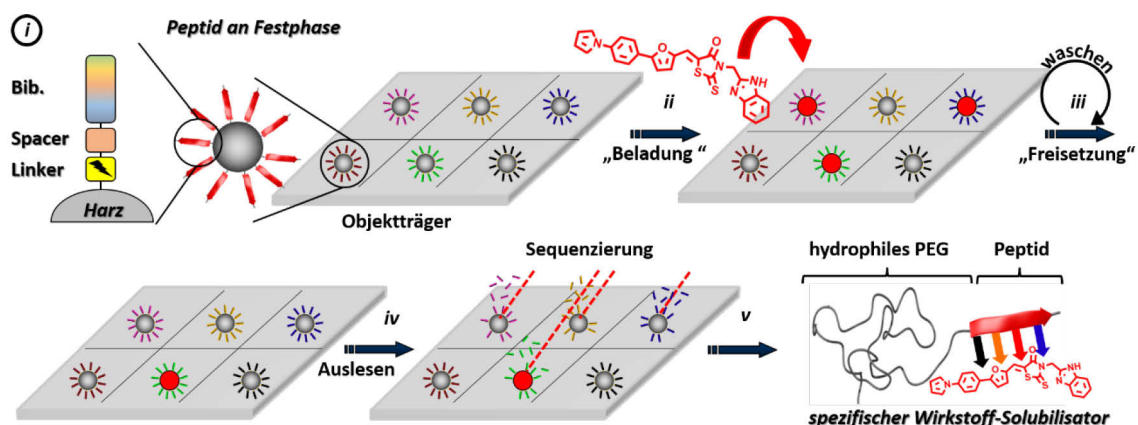


Abbildung 8. Konzept des Screenings zur Identifikation spezifischer Wirkstoffsolubilisatoren mit maßgeschneiderten Freisetzungseigenschaften. Eine mit Linker und Spacer ausgestattete Bibliothek wird auf einem Objektträger immobilisiert (i), mit BB17 beladen (ii), gewaschen (iii), ausgelesen und die Peptidsequenzen direkt mittels MALDI-ToF-MS² sequenziert (iv). Anschließend werden spezifische Wirkstoffsolubilisatoren realisiert (v).

3.1.2 Entwicklung der Screening-Methode

Um die Methode zu evaluieren, wurde zuerst ein Modellsystem entwickelt. Dazu wurde eine 14mer Bibliothek nach dem *Split&Mix* Ansatz synthetisiert, die aus der zuvor identifizierten 7mer Bindesequenz FFQKQQG und einer randomisierten 7mer Sequenz besteht.⁴ Als Festphase wurde dabei auf ein PEG-basiertes ChemMatrix®-Harz zurückgegriffen, welches im unmodifizierten Zustand keine Interaktionen mit BB17 zeigt. Als Linker zwischen Festphase und Peptidsequenz wurde Methionin gewählt, welches mittels Bromcyan in saurer Lösung gespalten werden kann.¹⁵³ Nach traditionellem Screening und Fragmentierung der Peptide (siehe 2.2.4 und 6.1) wurden aus dem Pool der Sequenzen zwei ausgewählt, von denen eine den Wirkstoff bindet (*SequenceBinding*, **SB**, KNNEFSFFFQKQQG) und die andere keine hohe Affinität zum Wirkstoff zeigt (*Sequence-NotBinding*, **SNB**, KKSGKLFFQKQQG).

SB und **SNB** wurden anschließend mittels Festphasenpeptidsynthese an einem ChemMatrix®-Harz synthetisiert. Dabei wurde die Linkerstrategie von Methionin zu dem photolabilen Linker 4-(4-(1-Aminoethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-buttersäure hin gewechselt, um ein lösemittelfreies Abspalten der Peptidsequenzen mittels UV-Licht von der Festphase zu ermöglichen (Abbildung 9). Dies ist besonders für orts aufgelöste Peptidsequenzierung notwendig und soll am Ende dieses Kapitels näher erläutert werden. Der photolabile Linker wird durch Bestrahlung mit UV-Licht in einen Singulett-Zustand überführt, welcher langsam durch einen Einzelelektrontransfer in einen radikalischen

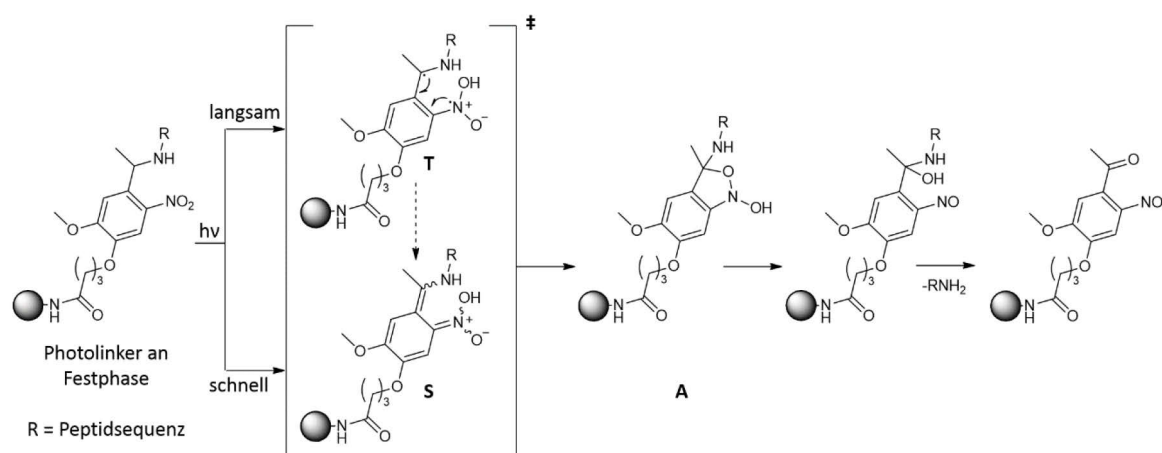


Abbildung 9. Mechanismus der Spaltung des Photolinkers und Freisetzung der Peptidsequenz mittels ultravioletttem Licht. T (Übergangszustand), S (o-quinoid-Übergangszustand) und A (Acetal-Zwischenstufe).

Tripletzustand übergeht. Durch Wasserstoffabstraktion bildet sich anschließend der radikalische Übergangszustand **T**, der sich in den o-quinoid-Übergangszustand **S** umlagert. **S** kann sich ebenfalls direkt aus dem angeregten Singulettzustand bilden, was im Vergleich zur Bildung von **T** schneller abläuft (5 ps *vs.* 1 ns) und damit den Hauptspaltungsweg darstellt. Die o-quinon-Spezies reagiert anschließend zu einer Acetal-Zwischenstufe (**A**) und eliminiert die Peptidsequenz (**RNH₂**) als C-terminales Amid, wobei die Reste des Photolinkers am Harz verbleiben.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶

Um die selektive Wirkstoffbindung der festphasengebundenen Peptide zu überprüfen, wurden diese mit BB17 (0.1mg/mL) in einer Lösung aus Reinstwasser:DMSO (1:1, v/v) für 24 h inkubiert und ausgiebig gewaschen. Anschließend wurden Wirkstoffanreicherungen in den Harzkügelchen unter einem Fluoreszenzmikroskop durch Fluoreszenzanregung bei 532 nm und Detektion der Fluoreszenz ≥ 580 nm identifiziert (Abbildung 10). Dabei wurden signifikante Unterschiede (Faktor 2) in der Fluoreszenzintensität von **SB** und **SNB** beobachtet. Interessanterweise zeigten Harzkügelchen mit der gleichen Peptidsequenz geringe Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten zueinander, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Methode hinweist. Leider ist die Identifikation von Wirkstoffanreicherungen mittels Fluoreszenzmikroskop für die spätere Anwendung in einer halbautomatisierten Methode ungeeignet, da zur Visualisierung eines vollständigen Objektträgers mehrere kleine Einzelaufnahmen manuell zusammengesetzt werden müssen. Es

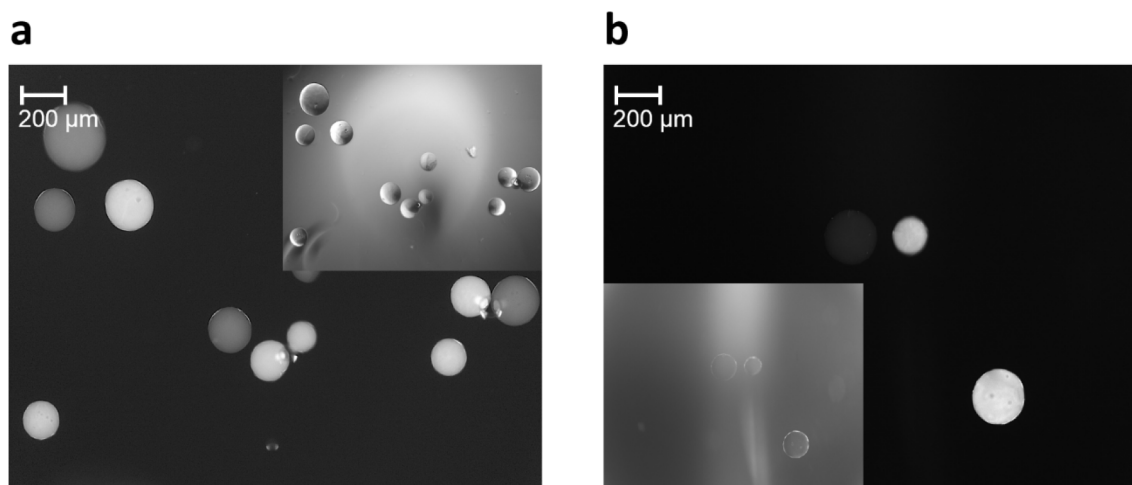


Abbildung 10. Fluoreszenzaufnahmen (groß) und Durchlichtaufnahmen (klein) von einer Mischung von **SB** und **SNB**. **SB** zeigte dabei höhere Fluoreszenzintensitäten als **SNB**. Direkte Aufnahmen (**a**) und mit geringerer Anregungsintensität (**b**).

wurde daher auf eine automatische Auslesung mittels Mikroarray-Scanner zurückgegriffen. Dieser rastert auf einem Objektträger platzierte Proben mit einer Auflösung von $10\text{ }\mu\text{m}$ und einer Anregungswellenlänge von 532 nm ab und detektiert die Intensität der Fluoreszenzemission bei $\geq 580\text{ nm}$. In einem Testdurchlauf wurden einige der mit **SB** und **SNB** modifizierten Harzkügelchen unter dem Fluoreszenzmikroskop per Handauslese selektiert und auf einem Objektträger platziert. Anschließend wurden diese bei einer Detektorsensitivität von $38\text{ }\%$ vermessen (Abbildung 11). Es konnten, wie auch unter dem Fluoreszenzmikroskop, deutliche und reproduzierbare Unterschiede zwischen **SB** und **SNB** ausgemacht werden. Da die subjektive Einschätzung von Signalintensitäten fehleranfällig ist, wurde eine softwarebasierte Auslesemethode etabliert. Dazu wurde ein optischer Schwellenwert auf die Bilder angewendet, der den Kontrast der einzelnen Fluoreszenzintensitäten verstärkt. Während nach Anwendung des Schwellenwerts alle Harzkügelchen von **SB** weiterhin sichtbar blieben, wurden die Harzkügelchen von **SNB** komplett gelöscht. Somit wurde eine Auslesemethode entwickelt, die im Gegensatz zum Fluoreszenzmikroskop vollständig automatisiert abläuft und geringere Fehleranfälligkeiten aufweist.

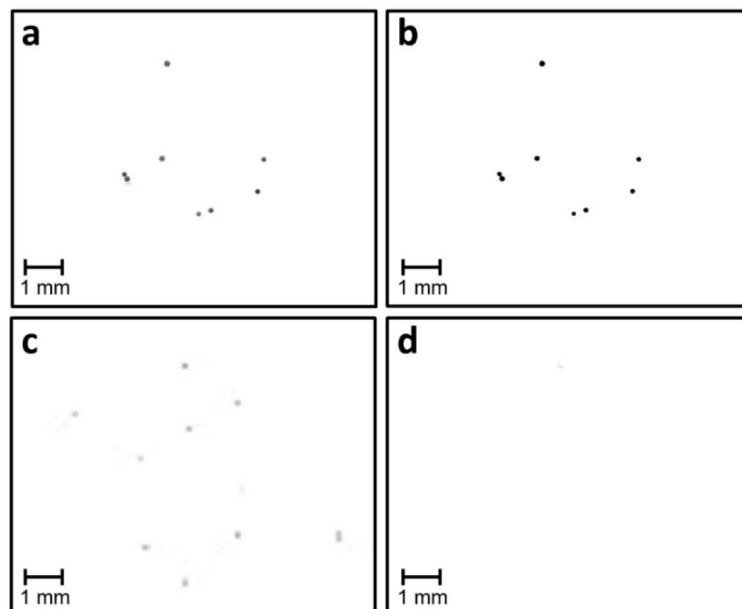


Abbildung 11. Messung der Fluoreszenzintensitäten von mit BB17 inkubierten **SB** und **SNB** bei 532 nm . Invertiertes Bild der Fluoreszenzintensitäten von **SB** (a), kontrastverstärktes Schwellenwert-Bild von **SNB** (b), invertiertes Bild der Fluoreszenzintensitäten von **SNB** (c) und kontrastverstärktes Schwellenwert-Bild von **SNB** (d).

Wie bereits erwähnt sollen die Harzkügelchen für die Erweiterung der Screening-Methode permanent immobilisiert werden. Dabei lieferten besonders zwei Methoden vielversprechende Ergebnisse. In einer ersten Methode werden die Harzkügelchen mit Hilfe von kommerziellem Sekundenkleber (Cyanacrylat-Klebstoff) auf einem für MALDI-Messungen geeigneten, elektrisch leitenden ITO-Objektträger (ITO = Indiumzinnoxid) befestigt (Abbildung 12, oben). Dazu werden Harzkügelchen auf einer Silikonmatte verteilt und mit Reinstwasser leicht angefeuchtet. Durch die Oberflächenspannung des verdunstenden Reinstwassers ordnen sich die Harzkügelchen in einer dicht gepackten, einlagigen Schicht an. Anschließend wird der mit einer dünnen Sekundenkleberschicht bestrichener ITO-Objektträger auf die verteilten Harzkügelchen gedrückt. Der Sekundenkleber polymerisierte durch den Kontakt mit Reinstwasser sofort und sorgt für eine permanente Immobilisierung der Harzkügelchen auf der Objektträgeroberfläche. Der Vorteil der nassen gegenüber einer trocknen Auftragung zeigte sich bei anschließenden Quell- und Trocknungsvorgängen. In wässrigen Lösungen können die Harzkügelchen auf die 2- bis 3-fache Größe quellen, weshalb sie einen entsprechenden Abstand zueinander benötigen, um sich

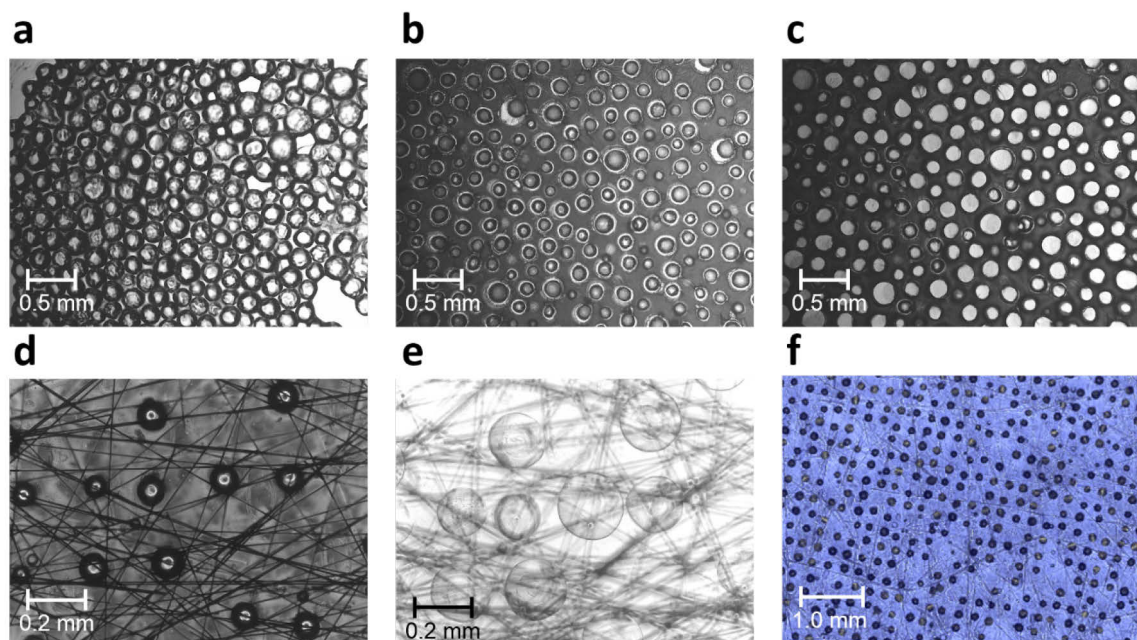


Abbildung 12. Immobilisierung von Harzkügelchen auf einem Objektträger mittels Sekundenkleber und Klebeband. Gequollene Harzkügelchen vor Immobilisierung (a), mit Sekundenkleber immobilisierte gequollene Harzkügelchen im getrockneten Zustand und im gequollenen Zustand (b, c), mit Klebeband immobilisierte Harzkügelchen im getrockneten Zustand (d), im gequollenen Zustand (e) und Durchlichtaufnahme eines größeren Ausschnitts (f).

nicht gegenseitig zu behindern. Während eine Auftragung von getrockneten Harzkügelchen in einer zu dichten Packung resultierte, gewährleistete die nasse Auftragung durch das Vorquellen des Harzes einen ausreichenden Abstand zwischen den Harzkügelchen. Wiederholende Quell- und Trocknungsvorgänge scheinen die Stabilität der Sekundenkleberschicht nicht zu beeinflussen: So konnten fünf aufeinanderfolgende Quell- und Trocknungszyklen eines modifizierten Objektträgers durchgeführt werden, ohne dass sich Harzkügelchen von der Oberfläche lösten. Auch Lösemittelgemische wie z. B. EtOH/Reinstwasser und DMSO/Reinstwasser wurden toleriert, womit sich diese Immobilisierung für lösungsmittelbasierte Inkubationsexperimente eignet. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die randomisierte Anordnung der Harzkügelchen auf dem Objektträger, die spätere Lokalisation erschwert. Auch wurden Fälle beobachtet, bei denen die Sekundenkleberschicht zu dick war, sodass einzelne Harzkügelchen komplett von Sekundenkleber umschlossen wurden. Daher wurde eine zweite, nicht auf Sekundenkleber basierende Methode entwickelt.

Hierfür wurde ein Objektträger mit einem doppelseitigen, elektrisch leitenden Klebeband modifiziert. Zur geordneten Auftragung der Harzkügelchen wird ein Sieb mit 150/200 μm Maschenweite auf den Objektträger gedrückt und die diesmal getrockneten Harzkügelchen manuell auf dem Sieb verteilt. Durch leichtes Verreiben der Harzkügelchen fallen die Harzkügelchen in die Lücken des Siebs und kommen in Kontakt mit der Kleboberfläche. Anschließend kann das Sieb entfernt werden. Dabei verbleiben die festgeklebten Harzkügelchen auf der Kleboberfläche und schwach adhärierte Kügelchen können mit Druckluft entfernt werden. Durch die Maschenabstände des Siebs wird dabei für einen ausreichenden Abstand der Harzkügelchen sowohl im getrockneten, als auch gequollenen Zustand zueinander gesorgt. Durchlichtaufnahmen der getrockneten und gequollenen Oberfläche bestätigen dies und zeigen zudem die erstaunlich hohe Ordnung der immobilisierten Harzkügelchen (Abbildung 12, d-f). Ebenfalls erkennbar sind die dünnen Kupferdrähte in der Polymermatrix des Klebebands, die für die in späteren MALDI-ToF-MS² Messungen notwendige elektrische Leitfähigkeit des Klebebands verantwortlich sind.

Zur Visualisierung der Vorteile der Immobilisierung in Kombination mit einer automatisierten Fluoreszenzanalyse wurde eine kleine Fraktion der inkubierten **SB** und **SNB** auf einem Objektträger immobilisiert und mittels Mikroarray-Scanner vermessen (Abbildung 13). Dabei konnten innerhalb von ca. zwei Minuten hunderte Harzkügelchen auf Wirkstoffanreicherungen überprüft werden. Diese innovative Methode stellt eine signifikante Verbesserung der etablierten, auf manueller Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop basierenden Vorgehensweise dar. Dabei erlaubt die Methode das schnelle Vermessen eines großen Probenraums, welches mit der Fluoreszenzmikroskopie nur durch aufwändige Einzelbildzusammensetzung möglich wäre.

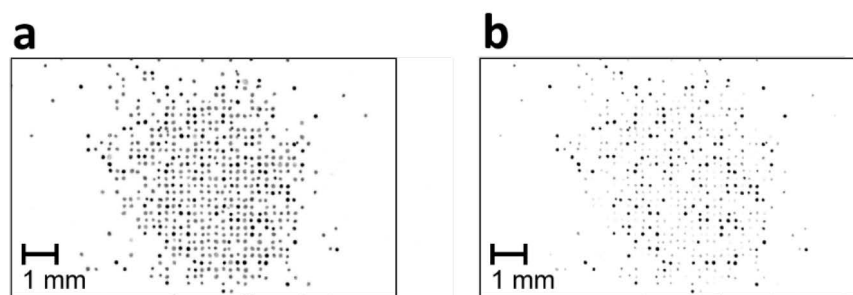


Abbildung 13. Auf Klebeband immobilisierte Mischung aus **SB** und **SNB** im Mikroarray-Scanner (a) und mit verstärktem Kontrast (b). Es wurde ein Verhältnis von **SB** zu **SNB** von 1:2.7 beobachtet.

MALDI-ToF-MS² Messungen direkt auf der Oberfläche der Harzkügelchen sollen nach einem erfolgreichen Screening das Identifizieren der Peptidsequenzen ermöglichen. Im ersten Schritt sollen die vollständigen Peptidsequenzen detektiert und diese dann durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert werden. Dabei werden die Peptide in einzelne Bruchstücke zerlegt, welche eine anschließende Rekonstruktion der Sequenzen erlauben. In einem Experiment wurde der mit **SB** und **SNB** beschichtete Objektträger für 2 h mit ultravioletttem Licht bestrahlt, wodurch die Peptide von der Festphase abgespalten wurden. Anschließend wurde die für MALDI-ToF-MS² Messungen benötigte Matrix (α -Cyano-4-hydroxymizinsäure, α -CHCA) mittels *Airbrush*-Prinzip aufgetragen.¹⁵⁷ Dazu wurde α -CHCA (10 mg/mL) in einer Reinstwasser:ACN Mischung (1:1, v/v + 0.1 % TFA) gelöst und aus ca. 15 cm Entfernung mit einer *Airbrush*-Pistole auf den Objektträger gesprüht. Die Matrix-Lösung bildet dabei kleinste Tröpfchen auf dem Objektträger und kokristallisiert mit den abgespaltenen Peptiden, ohne einen zusammenhängenden Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche zu bilden. Dies ist wichtig, da es sonst zu einer Verteilung

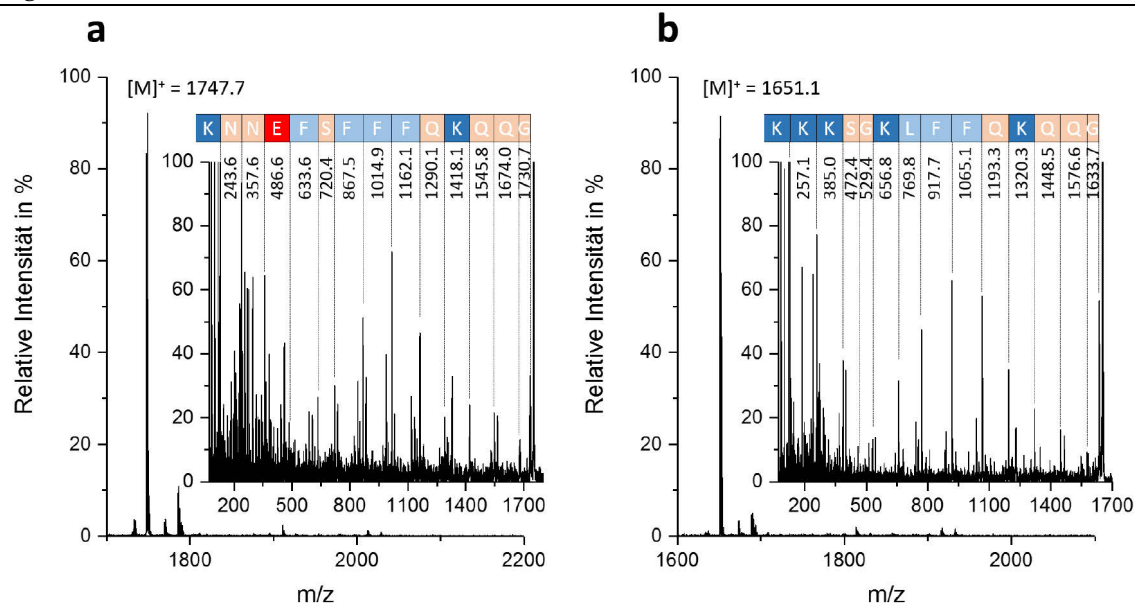


Abbildung 14. MALDI-ToF-MS² Messungen von **SB** (a) und **SNB** (b) zuerst im Reflektronmodus (großes Spektrum) und anschließender kollisionsinduzierter Fragmentierung der Peptide (kleiner Einschub). Bei den markierten Fragmenten handelt es sich der Übersicht halber nur um b-Fragmente.

der Peptidsequenzen auf dem Objektträger kommen kann, wodurch genaue und eindeutige Lokalisierungen der Peptidsequenzen während der MALDI-Messungen nicht mehr möglich sind. Sowohl **SB**, als auch **SNB** wurden erfolgreich auf der Oberfläche einzelner Harzkügelchen nachgewiesen und kollisionsinduziert fragmentiert (Abbildung 14). Eine Rekonstruktion der Sequenzen war durch die Auswertung der Abstände der einzelnen y- und b-Fragmente eindeutig möglich. Insgesamt wurden für **SB** 10/14 y-Fragmente und 14/14 b-Fragmente, für **SNB** 11/14 y-Fragmente und 14/14 b-Fragmente gefunden. Bei den fehlenden y-Fragmenten handelte es sich um Spezies mit sehr geringer bzw. sehr hoher Masse ($150 < m/z < 1200$), die durch Signalrauschen oder zu geringer Signalintensität nicht identifizierbar waren. Die direkt auf der Harzkugel aufgenommenen MS²-Spektren zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Peptiden, die mit Lösemittel aus der Harzkugel extrahiert und auf einem Standard-Stahlträger gemessen wurden, deutlich erhöhtes Signalrauschen. Dies lässt sich auf die geringe Analytmenge auf der Oberfläche der Harzkügelchen zurückführen, was jedoch nur einen geringen Einfluss auf die spätere Sequenzidentifikation hat. Anhand dieses Probesystems konnte gezeigt werden, dass neben einer Vereinfachung der Wirkstoffanreicherungsidentifikation auch die Sequenzidentifikation direkt auf den Harzoberflächen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Damit verbessert diese Methode nicht nur die Handhabung des bereits bestehenden Screening-Prozesses, sondern ermöglicht auch mehrstufige Screenings. Dabei können mehrere Eigenschaften

wie z. B. Wirkstoffbindung und -freisetzung der Peptide an der Harzkügelchenmatrix aufgrund der permanenten Fixierung in aufeinanderfolgenden Screeningschritten bestimmt werden.

3.1.3 Design der Screening-Methode

Nachdem in Vorexperimenten gezeigt wurde, dass die Methodik des weiterentwickelten Screenings erfolgsversprechend ist, soll ein vollständiges Screening mit BB17 durchgeführt werden. Hierzu wurde eine photolabile Peptidbibliothek (**Bib2**) synthetisiert. Um das breite Spektrum der möglichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie z. B. π - π -Wechselwirkungen, polaren bzw. hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Peptid und BB17 abzudecken, wurden sieben verschiedene proteinogene Aminosäuren für den randomisierten Teil der Bibliothek gewählt: Aromatisch/hydrophobes Phenylalanin (Phe), aliphatisch/hydrophobes Leucin (Leu), polares Serin (Ser) und Asparagin (Asn), basisches Lysin (Lys), saure Glutaminsäure (Glu) und konformativ bewegliches Glycin (Gly). Als Festphase wurde das bereits bewährte ChemMatrix®-Harz verwendet.

Eine reine 7mer Bibliothek ohne Spacer weist Peptidmassen in einem Bereich von 416.2 Da – 1046.5 Da ($7 \times \text{Gly}$ vs. $7 \times \text{Phe}$) auf, womit ein geringer Teil (ca. 10.6 %) des Sequenzbereichs aufgrund von zu geringen Molekulargewichten nicht durch MALDI-ToF-MS² sequenziert werden kann (Abbildung 15). Es muss daher auf einen Spacer zurückgegriffen werden, welcher ein Messen dieser Peptidsequenzen ermöglicht. Dabei soll der Spacer nicht nur die Molekulargewichte der Peptide auf > 700 Da anheben, sondern auch die Ionisierungs- und Fragmentierungseigenschaften der randomisierten Peptidsequenzen verbessern. Als Spacer wurde die Peptidsequenz **GGTERSG** gewählt, die aus polaren

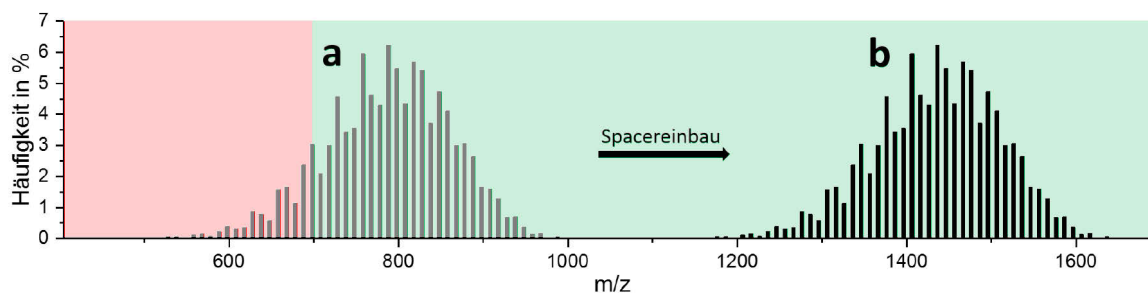


Abbildung 15. Theoretisch detektierbare Peptide einer 7mer Bibliothek mit den dazugehörigen m/z (a) und nach Einbau der Spacereinheit GGTERSG (b). Rot hinterlegt sind die m/z , die nur schwer im MALDI-ToF-MS detektierbar sind, grün die detektierbaren m/z .

Aminosäuren besteht, welche unspezifische Interaktionen der hydrophoben Wirkstoffe mit dem Spacer unterdrücken sollen. Arginin wurde als ionisierungsverstärkender Rest eingebaut, da es mit $pK_s = 12$ praktisch immer protoniert vorliegt. Der Einbau von Arginin kann jedoch gleichzeitig eine Verschlechterung des Fragmentierungsverhaltens bewirken, da die Verteilung des für die Fragmentierung verantwortlichen mobilen Protons über das Peptidrückgrat verhindert wird.¹⁵⁸ Durch den Einbau einer Glutaminsäure in direkter Nachbarschaft zum Arginin kann durch die negative Seitenkettenladung ein Zwitterion¹⁵⁹ mit der Argininseitenkette gebildet werden, welches eine positive Ladung des Arginins ausgleicht und eine weitere positive Ladung im Peptid ermöglicht. Damit steht ein zusätzliches Proton zur Verfügung, sodass eine intensive y/b-Fragment-Ionen-Bildung erwartet werden kann, wodurch die Fragmentierungseigenschaften positiv beeinflusst werden sollen.^{158,160-161} Zur Überprüfung, ob der Spacer als Ionisierungs- bzw. Fragmentierungsverstärker geeignet ist, wurde ein Alanin-Scan des Spacers durchgeführt. Dabei wurden die Aminosäuren des Spacers systematisch mit Alanin ausgetauscht und die Peptidsequenzen mittels MALDI-ToF-MS² untersucht (Abbildung 16). Hierbei zeigte sich, dass ein Austausch von Arginin zu einer drastischen Reduktion der Desorption führte, die eine weitere Fragmentierung des Peptids unmöglich machte. Dabei ist vermutlich nicht nur

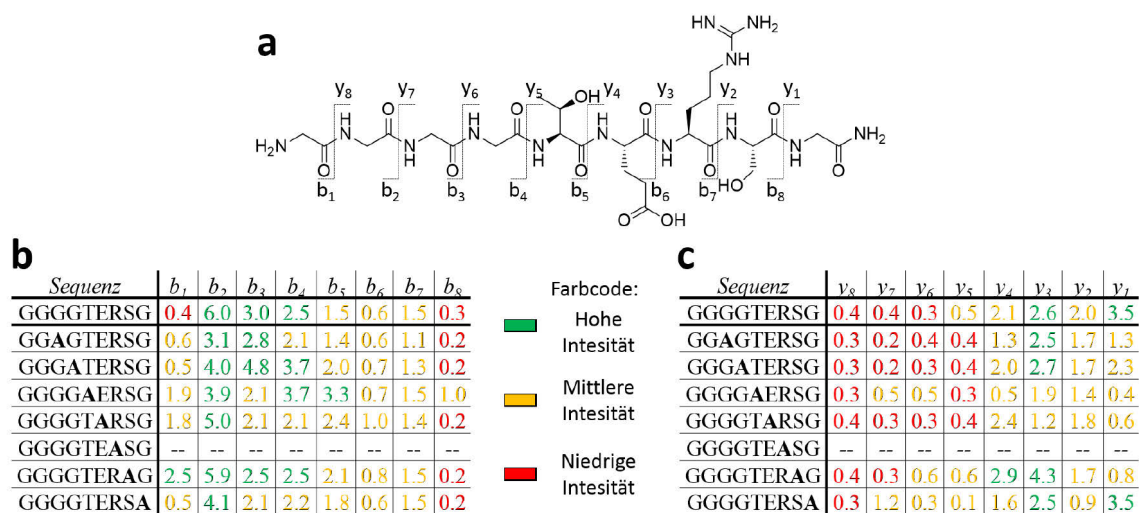


Abbildung 16. Untersuchung der Fragmentierungsintensitäten der erweiterten Spacereinheit GGGGTERSG (a) mittels Alanin-Scan im MALDI-ToF-MS². Die Intensitäten der b-Fragmente (b) und y-Fragmente (c) wurden relative zu dem entsprechenden Präkursorion in Prozent aufgetragen.

das Fehlen von Arginin für die geringe Desorption verantwortlich, sondern auch die negative Ladung der Glutaminsäure, die ein Protonieren des Moleküls erschwert. Weiterhin ist ersichtlich, dass bei allen Peptiden die γ -Fragmente des C-terminalen Bindungsbruchs der Glutaminsäure die höchsten Intensitäten zeigen (γ_3). Analog dazu reduziert sich die Intensität des entsprechenden γ_3 -Fragments (GGGGTARSG) nach Austausch der Glutaminsäure signifikant. Ebenfalls deutlich zeigte sich der Einfluss von Glutaminsäure auf die Intensitäten der b-Fragmente. Dabei wurden bei Austausch von Glutaminsäure die Intensitäten der für die Sequenzrekonstruktion wichtigen N-terminalen Fragmente (b_2 - b_4) reduziert. Auch die Seitenketten von Serin und Threonin scheinen einen Einfluss auf die Fragmentierung zu haben. Während der Austausch von Threonin die Intensitäten der γ -Fragmente reduzierte, konnten bei dem Austausch von Serin teilweise sogar Intensitätserhöhungen festgestellt werden. Die Einflüsse waren jedoch geringer als die beim Austausch von Arginin und Glutaminsäure und bestätigen damit den Einsatz des Spacers als ionisierungs- und fragmentierungsverstärkendes Segment. Weiterhin zeigten Inkubationsexperimente mit BB17, dass die festphasengebundene Spacersequenz nicht mit dem Wirkstoff interagiert und somit das Screening nicht negativ beeinflusst. Dementsprechend wurde **Bib2** mit der hier beschriebenen Spacereinheit und dem photolabilen Linker synthetisiert (Abbildung 17). Die finale Beladung der Bibliothek betrug $0.8 \mu\text{mol/g}$.

Für die entwickelte Screening-Methode wäre es zudem vorteilhaft, wenn auch die Sequenzierung der Peptide vollautomatisch ablaufen würde. Dazu wurde auf das MALDI-Imaging zurückgegriffen, welches eine vorgegebene Fläche automatisch abrastert und vermisst. Um die Effizienz des Ansatzes zu überprüfen, wurde ein MALDI-Imaging

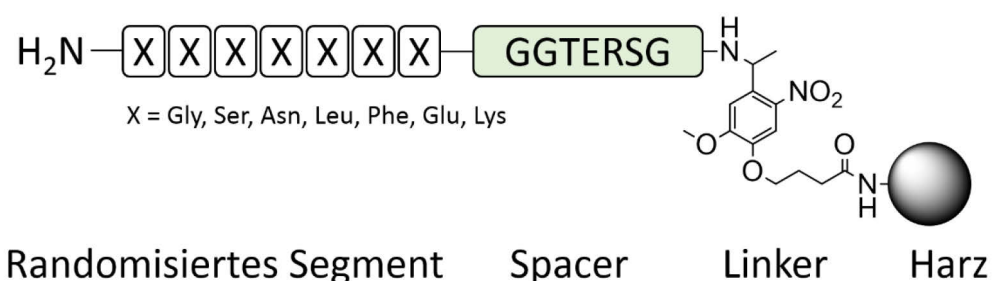


Abbildung 17: Aufbau der photolabilen Peptidbibliothek **Bib2** mit Linker, Spacer und randomisiertem 7mer Segment.

einer immobilisierten Fraktion von genau 100 Harzkügelchen der Peptidbibliothek **Bib2** durchgeführt (Abbildung 18). Dabei konnten auf jeder Harzkugel eindeutige Massesignale detektiert werden. Durch Auswahl eines Massefilters konnte nachgewiesen werden, dass sich jeweils nur eine individuelle Peptidsequenz auf den Harzkügelchen befindet (siehe Abbildung 10, c). Auf der abgebildeten Harzkugel befindet sich z. B. ein Peptid mit einer Masse von $[M+H]^+ = 1542.8$ Da, sodass das Peptid rechnerisch aus einer Kombination der Aminosäuren $2 \times \text{Phe}$, $1 \times \text{Leu}$, $1 \times \text{Lys}$, $1 \times \text{Ser}$ und $2 \times \text{Glu}$ ($[M+H]^+ = 1542.7$ Da) bestehen muss. Bei Auswahl eines zufällig gewählten Massefilters mit m/z 1588.59 ± 20 zeigten 3 % der Harzkügelchen Peptide in diesem Massebereich an. Da theoretisch 2.75 % der Harzkügelchen der Bibliothek Peptide in einem Massebereich von $[M+H]^+ = m/z$ $1568.59 - 1608.59$ tragen, entsprechen die Messergebnisse den Erwartungen. Ein vollständig automatisiertes Auslesen der Peptidsequenzen mittels MALDI-Imaging scheint damit möglich und stellt eine Alternative zum manuellen Messen dar. Jedoch limitiert der zeitliche Aufwand des automatisierten Messens den Einsatz in einer Routinemethode: So benötigte das MALDI-Imaging für den ca. 9 mm^2 großen Ausschnitt ohne zeitaufwändiges Fragmentieren bereits 25 h. Für die weiteren Messungen wurde daher vorerst auf manuelles, nicht automatisiertes Messen zurückgegriffen.

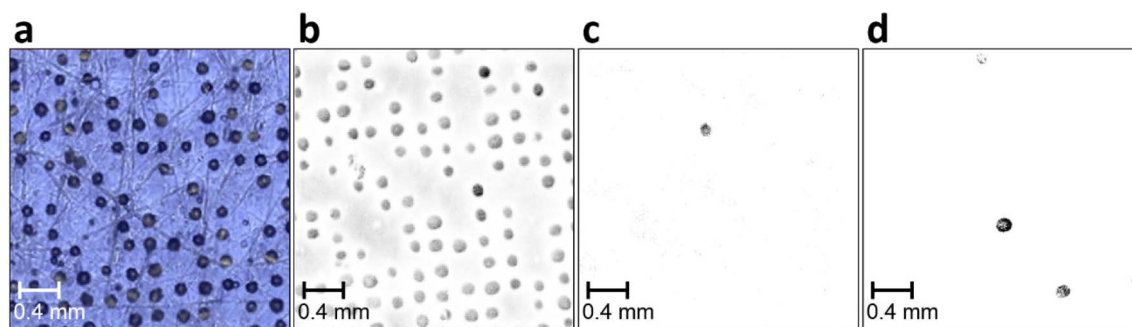


Abbildung 18. MALDI-Imaging der immobilisierten **Bib2**. Durchlichtaufnahme des entsprechenden Ausschnitts (a), detektierte Massesignale (b), Beispiel für ein Peptid mit m/z 1542.8 (c) und eine Messung mit mehreren detektierten Peptiden mit m/z 1588.59 ± 20 (d).

3.2 Screening von BB17 gegen eine Peptidbibliothek

Im Folgenden soll nun ein vollständiges, mehrstufiges Screening der immobilisierten Bibliothek gegen den wasserunlöslichen Wirkstoff BB17 durchgeführt werden. Ziel dabei ist es, Transportsysteme mit einer hohen Kapazität und definierten Freisetzungseigenschaften zu realisieren.

3.2.1 Identifikation maßgeschneiderter Peptidsequenzen

Für das Screening von BB17 zur Identifizierung maßgeschneiderter Konjugate wurde eine Fraktion der photolabilen **Bib2** mittels doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger immobilisiert und in einer Lösung aus Reinstwasser:DMSO (1:1, v/v) vorgequollen. Anschließend wurde die Mischung verworfen und der Objektträger in einer Lösung von BB17 in Reinstwasser:DMSO (0.1 mg/mL, 1:1, v/v) inkubiert. Dabei sorgte das DMSO für eine ausreichende Löslichkeit des Wirkstoffes, um eine Auskristallisation in den Harzkügelchen zu vermeiden. Nach Schütteln über Nacht wurde der beschichtete Objektträger für 2 h mit einer Waschlösung (Reinstwasser:DMSO, 1:1, v/v) gespült um unspezifisch gebundenes BB17 zu entfernen. Anschließend wurde der Objektträger im Mikroarray-Scanner auf die Fluoreszenzintensitäten der Harzkügelchen analysiert. Hierbei konnten deutliche Wirkstoffanreicherungen in einigen Harzkügelchen detektiert werden. Circa 3 % der Harzkügelchen zeigten ein Fluoreszenzsignal, welches über der Grenze von 80 % des intensivsten beobachteten Fluoreszenzsignals eines Harzkügelchens lag, was für eine gute Selektivität spricht (Abbildung 19, a und c). In einem weiteren Schritt sollten nun die Wirkstofffreisetzungseigenschaften der einzelnen Peptide untersucht werden. Diese Eigenschaften spielen besonders für den Wirkstofftransport in biologischen Systemen eine wichtige Rolle, bei denen teilweise schnelle Freisetzungskinetiken (z. B. Übertragung von Photosensibilisatoren auf das Humanalbumin), aber auch Retardierung des Wirkstoffes (z. B. bei blutdruckregulierenden Medikamenten) erwünscht sind. Die Wirkstofffreisetzungen gegenüber Albumin (BSA, bovines Serumalbumin) eignet sich dabei als Modellsystem, da die Aminosäurezusammensetzung des Albumins dem des Humanalbumins ähnelt und damit ein vereinfachtes Blutplasma-proteinmodell darstellt.¹⁶² Dazu wurde eine Lösung mit 50 mg/mL BSA, entsprechend der Humanalbuminkonzentration im Blut eines gesunden Menschen, in Reinstwasser gelöst und die immobilisierte

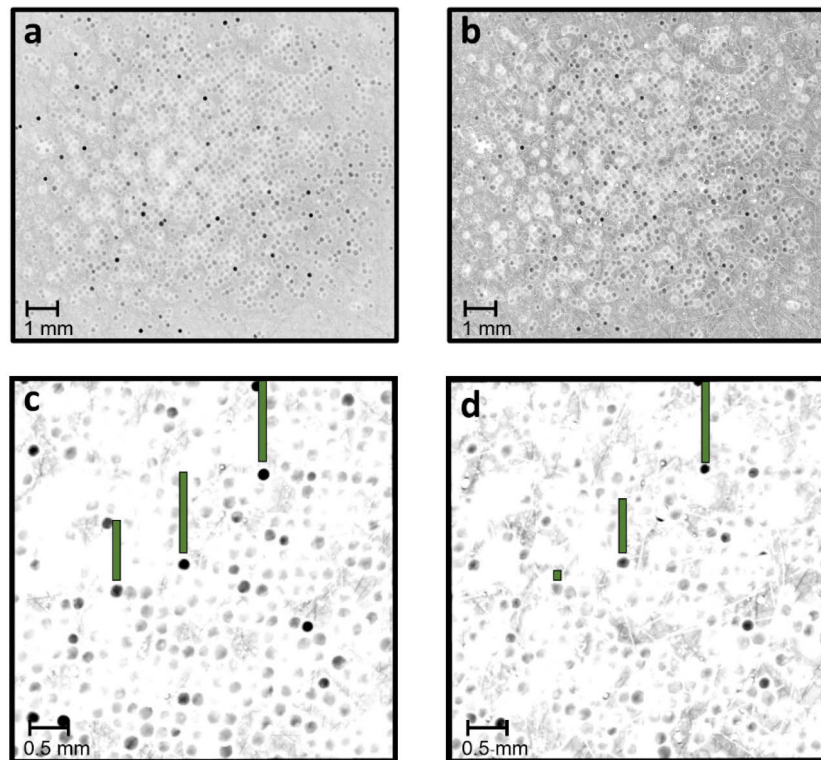


Abbildung 19. Invertierte Aufnahmen des Mikroarray-Scanners nach Inkubation mit BB17 (a) und nach Waschen mit BSA (b). Zur besseren Visualisierung von Wirkstoffanreicherungen wurde ein kleiner Ausschnitt mit erhöhtem Kontrast erzeugt, jeweils nach BB17 Inkubation (c) und nach Waschen mit BSA (d). Grüne Balken repräsentieren die Signalintensitäten eines *Keepers*, *medium Releasers* und *Releasers*.

Bib2 in dieser Lösung über Nacht inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde diese erneut im Mikroarray-Scanner analysiert (Abbildung 19, b und d). Dabei konnten deutliche Intensitätsunterschiede im Vergleich zu den Messungen nach Wirkstoffinkubation festgestellt werden. Während einige Harzkügelchen den Wirkstoff effizient hielten, gaben andere den Wirkstoff während des BSA-Waschschrattes vollständig ab. Eine Einteilung der Harzkügelchen erfolgte nach folgenden Kriterien: *Keeper* (engl. für: Wirkstoffhalter) hielten den Wirkstoff ($> 70\%$) während des Waschvorgangs, *medium Releaser* (engl. für: mittlere Wirkstofffreisetzer) hielten den Wirkstoff teilweise ($70\% > x > 20\%$) und *Releaser* (engl. für: Wirkstofffreisetzer) konnten den Wirkstoff während des Waschschratts nicht halten ($< 20\%$). Eine statistische Auswertung ergab, dass ca. 20 % der Harzkügelchen als *Keeper*, 40 % als *medium Releaser* und 40 % als *Releaser* eingestuft werden können. Somit konnten im Screening Peptide mit unterschiedlichen Beladungs- und Freisetzungseigenschaften identifiziert werden.

3.2.2 Sequenzierung der Peptide

Nach Identifizierung von *Keepern*, *medium Releasern* und *Releasern* wurde der Objektträger mit ultravioletttem Licht bestrahlt und anschließend wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben im MALDI-ToF-MS² vermessen. Aufgrund der Komplexität der Auswertung der Fragmentspektren wurde eine Spec2Seq-Softwareⁱⁱ (eng: *Spectrum to Sequence*, Spektrum zu Sequenz) programmiert, welche automatisch Fragmentspektren in die zugehörigen Sequenzen übersetzt.¹⁶³ Dabei werden die intensivsten Signale der Fragmentspektren automatisch von der Software detektiert und mit einer im Hintergrund abgelegten Peptidbibliothek verglichen. Anschließend wird dem Spektrum die Sequenz mit größter Fragmentübereinstimmung zugeordnet. Um den Erfolg der Sequenzzuordnung zu quantifizieren, wurde ein Punktesystem (Score) eingeführt, welches die Anzahl der identifizierten Fragmente bestimmt und gewichtet. Den erfolgreich erkannten b/y-Fragmenten werden dabei 10 Punkte zugewiesen, den a/z-Fragmenten und b/y-NH₃/H₂O-Fragmenten jeweils 2 Punkte. Die Unterschiede in der Gewichtung der Punkte lassen sich auf die Hauptfragmentierungswege zurückführen, bei denen b/y-Fragmentierungen häufiger auftreten als a/z-Fragmentierungen und damit stärker berücksichtigt werden. Die theoretisch mögliche maximale Punktzahl ist in der Praxis jedoch nicht erreichbar, da zum einen nicht alle Fragmente gleiche Auftrittswahrscheinlichkeiten aufweisen, zum anderen das Signalrauschen besonders im niedermolekularen/hochmolekularen Bereich stark ist und eine Zuordnung erschwert. Abbildung 20 zeigt das gemessene Spektrum einer im Screening identifizierten Peptidsequenz und die Zuordnung der entsprechenden Fragmente. Dabei konnten automatisiert 10/14 y-Fragmente und 7/14 b-Fragmente zugeordnet werden. Die fehlenden Fragmente zeigten teilweise zu geringe Intensitäten um automatisiert zugeordnet zu werden, konnten jedoch manuell nachgewiesen werden. Dennoch ist die Anzahl der Fragmente aus der automatischen Erkennung ausreichend, um die Sequenz eindeutig zuzuordnen. Theoretisch sind für die Sequenzidentifikation nur die Fragmente b₁-b₇, bzw. y₈-y₁₄ notwendig, da diese bereits die vollständige Sequenzinformation der randomisierten Einheit enthalten. Die y₁₋₇/b₈₋₁₃-Fragmente, die zu der Spacereinheit gehören, können als

ⁱⁱ Die Erstellung der Spec2Seq Software wurde in Zusammenarbeit mit TIMM SCHWAAR von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung durchgeführt.

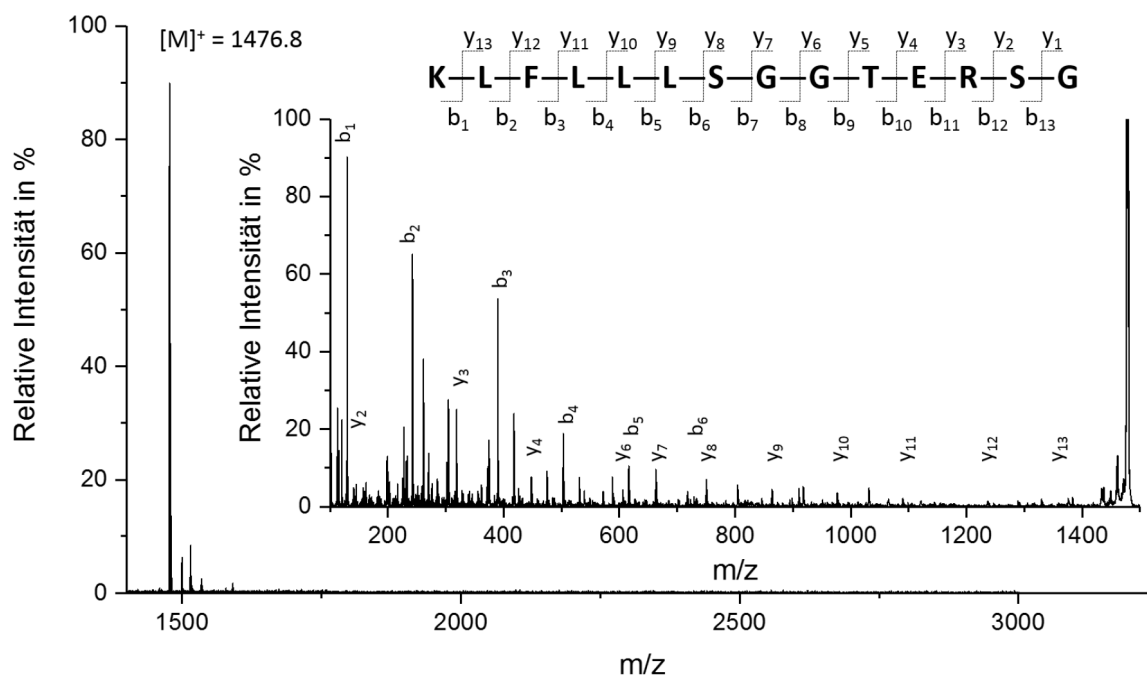


Abbildung 20. MALDI-ToF-MS-Messung (großes Spektrum) und anschließende Fragmentierung einer Peptidsequenz mit der Sequenz KLFLLSGGTERSG auf der Harzkugeloberfläche (kleiner Einschub). Zur besseren Übersicht sind nur b/y-Fragmente abgebildet.

zusätzlicher interner Standard genutzt werden, da die Fragmente bei allen gemessenen Peptiden der Bibliothek die gleichen m/z Verhältnisse aufweisen sollten.

Es wurden insgesamt 61 Harzkügelchen ausgewählt und sequenziert, wobei sieben Peptide als *Keeper*, sieben als *medium Releaser* und sieben als *Releaser* identifiziert wurden (Abbildung 21). Die restlichen 40 Peptide wurden als nicht-Binder klassifiziert. Wie zu erwarten, zeigten die *Keeper*-Sequenzen einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (> 70 %), wobei Phenylalanin mit insgesamt 45 % die häufigste Aminosäure darstellte. Der Anteil der hydrophilen Aminosäuren war mit < 30 % deutlich geringer und der Anteil der ionischen Aminosäuren (2 %) vernachlässigbar. Bei den *medium Releasern* reduzierte sich der Anteil der hydrophoben Aminosäuren auf 50 %, wohingegen der ionische Anteil auf 18 % anstieg. Dabei blieb der Prozentsatz an Phenylalanin konstant, während sich der Anteil von Leucin von 27 % auf 10 % reduzierte. Die *Releaser* zeigten, ähnlich wie die *medium Releaser*, einen hydrophoben Anteil von 50 %, jedoch stieg der Anteil der ionischen Aminosäuren auf Kosten der hydrophilen Aminosäuren auf > 30 %. Damit lässt sich ein Zusammenhang von Wirkstofffreisetzungseigenschaften und Anteil an ionischen Aminosäuren erkennen. Auch wenn eine genauere Bindungsmotivanalyse keine übergeordneten

Bindestrukturen aufzeigte, ist erkennbar, dass blockweise angeordnete hydrophobe Aminosäuren für eine gute Wirkstoffbindung vorteilhaft sind. Ebenfalls scheinen ionische Aminosäuren positiv zur Wirkstoffbindung beizutragen, möglicherweise über inter- und intramolekulare Wechselwirkungen. Die nicht-bindenden Peptidsequenzen zeigten eine annähernde statistische Verteilung der Aminosäuren, mit einem leichten Überschuss an hydrophilen Aminosäuren. Überraschenderweise zeigten einige nicht-bindende Sequenzen ebenfalls einen erhöhten Anteil an hydrophoben Aminosäuren (siehe Kapitel 6.1). Im Gegensatz zu den bindenden Peptiden waren diese jedoch nicht blockweise angerichtet, sondern von hydrophilen/ionischen Aminosäuren umgeben, womit die Bindeaffinitäten anscheinend nicht ausreichend sind um BB17 effektiv zu binden. Damit bestätigt sich ebenfalls die hohe Sequenz- und Strukturspezifität der Bindung zwischen Peptid und Wirkstoff: Nicht nur das Vorkommen bestimmter Aminosäuren, sondern auch deren Anordnung haben einen Einfluss auf die Bindung.

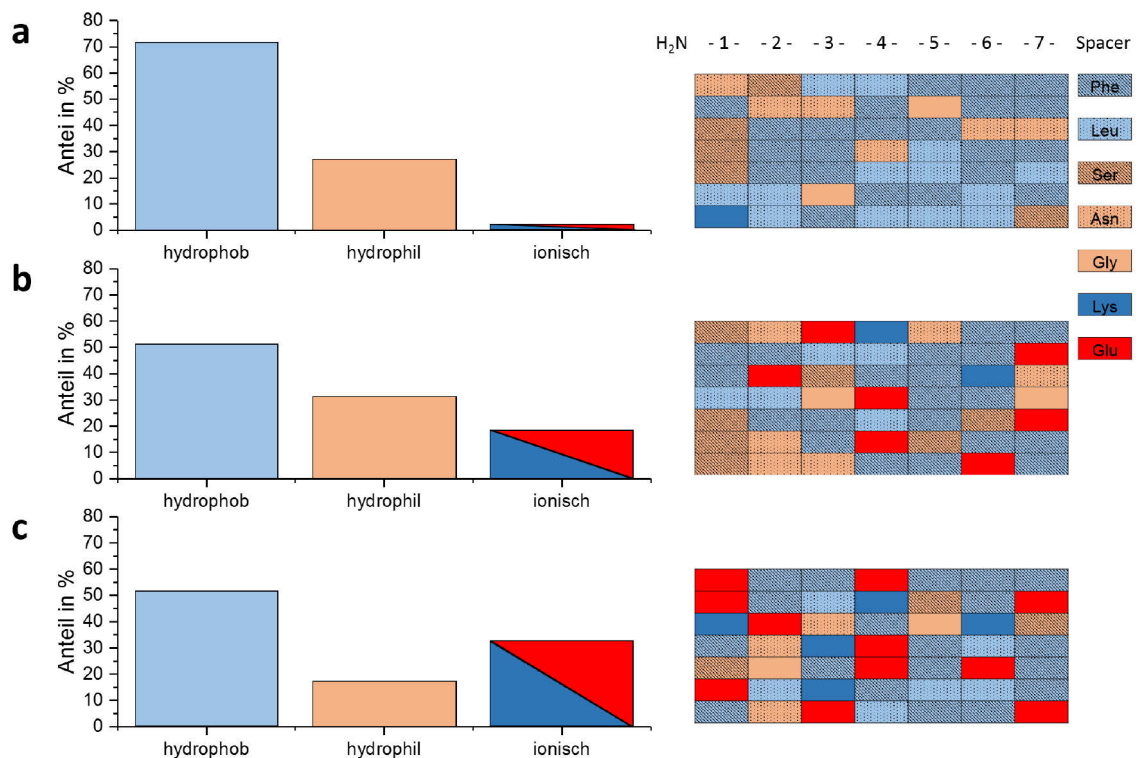


Abbildung 21. Ergebnisse des Screenings für *Keeper* (a), *medium Releaser* (b) und *Releaser* (c). Links wurde der relative Anteil der Aminosäuren in den jeweiligen Sequenzkategorien aufgetragen, rechts die detektierten Sequenzen.

3.2.3 Synthese und Charakterisierung der Peptid-Polymer-Konjugate

Aus den drei verschiedenen Kategorien wurde jeweils eine für weitere Experimente ausgewählt, um die in dem Screening identifizierten Eigenschaften zu bestätigen. Hierbei sollten die einzelnen Sequenzen in systematischer Beziehung zueinander stehen, um Rückschlüsse auf die für eine Wirkstoffbindung und Wirkstofffreisetzung wichtigen Motive zu erhalten. Für die *Keeper* fiel die Wahl auf die Sequenz KLFLLLS (**Pep₁**), welche einen ausgedehnten hydrophoben Block aufweist (LFLLL) und damit den Wirkstoff effektiv binden kann. Als *medium Releaser* wurde SNNFFEF (**Pep₂**) gewählt, welche aus einer polaren, N-terminalen Sektion (SNN) und einem gestörten hydrophoben Block (FFEF) besteht. Die Kategorie der *Releaser* wird durch die Sequenz ELKFLLF (**Pep₃**) repräsentiert, welche zwei voneinander getrennte ionische Aminosäuren (ELK) und einen im Vergleich zu **Pep₁** kleineren hydrophoben Block (FLLF) aufweist. Auch aus der Kategorie der nicht-Binder wurde eine Kontrollsequenz KNLKKNG (**Pep₄**) gewählt, welche sowohl aus ionischen und hydrophilen, als auch einer hydrophoben Aminosäure besteht. Die Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese an einem mit einem Polyethylenoxid-Block ($M_n = 3.2 \times 10^3$ und $D = 1.04$) vorbeladenen PAP-Harz hergestellt und nach erfolgreicher Synthese und Aufreinigung als Peptid-Polymer-Konjugate **Pep₁₋₄-PEG** erhalten. Zusätzlich wurden die entsprechenden *14mere* (7mer Peptidsequenz + Spacer **GGTERSG**) von **Pep₁₋₃** als Konjugate **Pep₁₋₃-Spacer-PEG** synthetisiert.

Die Peptid-Polymer-Konjugate sollen in der Lage sein den Wirkstoff BB17 zu binden und in wässrigen Lösungen zu solubilisieren. Um diese Eigenschaften zu testen wurden die Peptid-Polymer-Konjugate (2.08 μmol) in Reinstwasser (1 mL) gelöst und zu einer BB17 Lösung in DMSO (1 mg/mL, $n_{\text{BB17}} = 2.08 \mu\text{mol}$) gegeben. Nach Durchmischen für 1 h wurde die Mischung gefroren und über Nacht gefriergetrocknet, um das DMSO zu entfernen. Die Rückstände wurden in 1 mL Reinstwasser für 1 h resolubilisiert und nicht gelöste Rückstände durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde in UV/Vis Messungen die Absorption bei 472 nm und durch Vergleich mit einer Kalibrationsgeraden die BB17 Konzentration der Lösungen bestimmt.

Dabei zeigten **Pep₁-PEG** und **Pep₃-PEG** mit Wirkstoffaufnahmekapazitäten von 1:3.4 bzw. 1:4.0 (mmol BB17 (solubilisiert)/mmol Konjugat) ähnliche Beladungskapazitäten, was an den ausgedehnten hydrophoben Blöcken liegen könnte. **Pep₂-PEG**, welches nur drei hydrophobe, nicht direkt miteinander verbundene Aminosäuren beinhaltet, zeigte mit 1:6.7 geringere Aufnahmekapazitäten. Dabei wurde bei den Solubilisierungsexperimenten keine 1:1 Bindung von Konjugat und Wirkstoff erreicht, was für eine Aggregatbildung der Konjugate und eine komplexe Bindung des Wirkstoffes spricht. Die Kontrolle **Pep₄-PEG** wies wie zu erwarten geringe Beladungskapazitäten auf (Tabelle 1).

Tabelle 1. Beladungskapazitäten der Peptid-Polymer-Konjugate.

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration BB17 in $\mu\text{mol/mL}$	Verhältnis BB17/Konjugat In mmol/mmol
Pep₁-PEG/ Pep₁-Spacer-PEG	0.61/1.39	1:3.4/ 1:1.5
Pep₂-PEG/ Pep₂-Spacer-PEG	0.31/ 0.99	1:6.7/ 1:2.2
Pep₃-PEG/ Pep₃-Spacer-PEG	0.52/ 1.49	1:4.0/ 1:1.4
Pep₄-PEG	0.04	1:51

Im direkten Vergleich zu den *7meren* **Pep₁₋₃-PEG** nahmen die *14mere* **Pep₁₋₃-Spacer-PEG** bis zu 300 % mehr Wirkstoff auf. Dies ist verwunderlich, da die Spacereinheit **Spacer-PEG** (GGTERSG-PEG) als schlechter Binder getestet wurde und damit einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Wirkstoffbeladung haben sollte. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen und damit die Screening-Methode zu verifizieren, wurde **Pep₁-Spacer-PEG** schrittweise synthetisiert und jede Spezies, beginnend mit dem *1mer*, auf die Wirkstoffaufnahmefähigkeit untersucht. Ebenfalls wurde ein *14mer* Konjugat bestehend aus (**Spacer**)₂-PEG (GGTESRSGGGTERSG-PEG) und reines PEG₁₀₀₀ mit dem Wirkstoff inkubiert und vermessen (Abbildung 22). Es zeigte sich, dass die reine Spacereinheit eine geringe Wirkstoffaufnahme von 1:39 aufweist, was in etwa der Wirkstoffaufnahme von reinem PEG entspricht (1:45). Damit kann die Spacereinheit als inert betrachtet werden. Bei Kupplung der ersten hydrophoben Aminosäure (LSGGTERSG-PEG) der Bindesequenz zeigt sich ein leichter Anstieg der Wirkstoffaufnahme (1:15). Dieser Trend setzt sich fort, bis nach Kupplung der

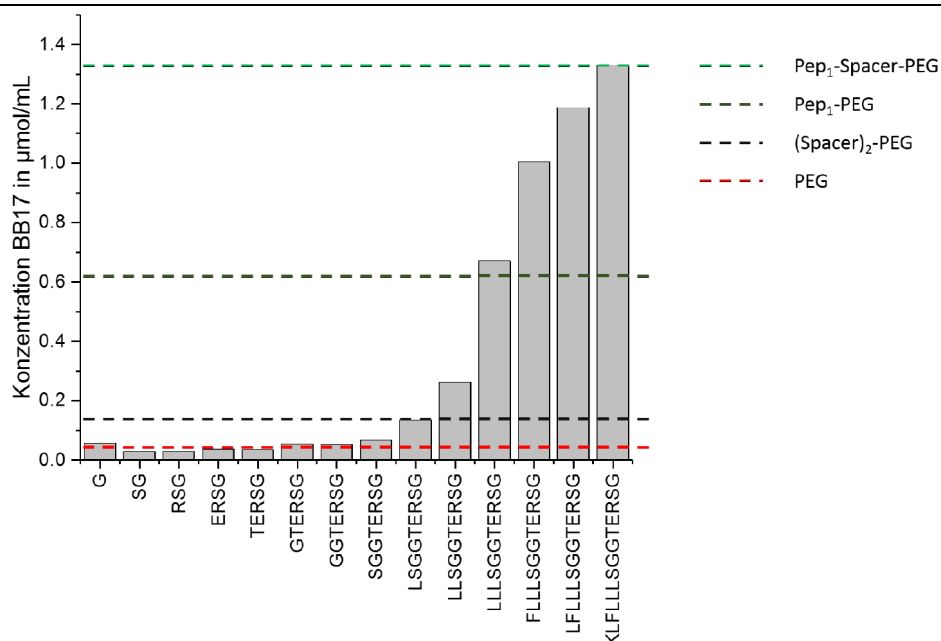


Abbildung 22. Test der Spacersequenz und deren Einfluss auf die Beladungskapazität von **Pep1-Spacer-PEG**. Dafür wurde **Pep1-Spacer-PEG** schrittweise an einem PEG-Harz aufgebaut und jede Spezies auf die Wirkstoffaufnahme, normiert auf das jeweilige Molekulargewicht, untersucht.

ersten drei Leucine (LLLSSGGTERSG-PEG) bereits die Beladungskapazität des *7mers* **Pep1-PEG** überschritten wird (1:3.1). Die letzten Aminosäuren (KLF) erhöhen schließlich die Ladungskapazität auf 1:1.5. Dabei zeigte selbst der Einbau des basischen Lysins einen positiven Effekt, der jedoch möglicherweise nicht auf Bindung des Wirkstoffes, sondern auf der Vergrößerung der Peptideinheit beruht. Dieser Effekt der vergrößerten Peptideinheit konnte auch bei **(Spacer)₂-PEG** beobachtet werden. Hierbei erhöhte sich bei Verdopplung der Peptidsequenz die Beladungskapazität im Vergleich zu **Spacer-PEG** um das 3-fache, was durch die Größe der Peptideinheit begründet werden kann. Daraus lässt sich ableiten, dass der Spacer als Teil der Peptidsequenz zwar einen Einfluss auf die Beladungskapazität der Pep-PEG Konjugate hat, jedoch nicht direkt das Screening-Verfahren beeinflusst.

3.2.4 Einfluss der Aggregatbildung auf die Wirkstoffsolubilisierung

Es ist bekannt, dass Peptid-Polymer-Konjugate in wässrigen Lösungen kolloidal stabile Aggregate bilden, z. B. in Mizellarer oder auch in zylindrischer Form.⁹¹ Dabei bilden die hydrophoben Peptidsequenzen mit Bindungseigenschaften im Idealfall einen Kern, in dem der Wirkstoff eingelagert werden kann und das hydrophile PEG eine äußere, löslichkeitsvermittelnde Hülle. Zur Ermittlung der Aggregatgrößen wurden die Konjugat-Wirkstoff-Komplexe mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht (Tabelle 2). **Pep3-**

PEG zeigte mit einem hydrodynamischen Radius (R_h) von $R_h = 16$ nm die kleinsten Aggregate, gefolgt von **Pep₂-PEG** mit $R_h = 30$ nm und **Pep₁-PEG** $R_h = 60$ nm. Aufgrund der beobachteten hydrodynamischen Radien ist die Bildung von mizellaren Konstrukten unwahrscheinlich. Dennoch eignen sich die gebildeten Aggregate der **Pep-Spacer-PEG**-Konjugate aufgrund der Aggregatgröße von < 100 nm als Wirkstofftransporter.¹⁴⁹

Tabelle 2. Hydrodynamische Radien der Konjugate **Pep₁₋₃-PEG** und **Pep₁₋₃-Spacer-PEG** und kritische Aggregationskonzentration (*cac*) von **Pep₁₋₃-PEG**. n.d. = nicht bestimmt.

Peptid-Polymer-Konjugat	R_h in nm	<i>cac</i> in mol/L
Pep₁-PEG/ Pep₁-Spacer-PEG	$60 \pm 30/ 57 \pm 31$	$2.1 \times 10^{-7}/$ n.d.
Pep₂-PEG/ Pep₂-Spacer-PEG	$30 \pm 11/ 31 \pm 41$	$1.5 \times 10^{-7}/$ n.d.
Pep₃-PEG/ Pep₃-Spacer-PEG	$16 \pm 7/ 17 \pm 7$	$1.4 \times 10^{-7}/$ n.d.

Da die Wirkstoffaufnahmefähigkeit der Konjugate jedoch nicht nur durch direkte Peptid/Wirkstoff-Interaktionen, sondern auch durch die Aggregation der Peptid-Polymer-Konjugate beeinflusst werden kann, wurden die kritische Aggregationskonzentrationen (*cac*) der unbeladenen Konjugate mittels Tensiometrie ermittelt. Dafür wurde eine Titration der Aggregate in Wasser durchgeführt und die Oberflächenspannung über die Ringmethode bestimmt. Die Oberflächenspannung ändert sich drastisch, sobald Aggregationsbildung auftritt. Für **Pep₂-PEG** und **Pep₃-PEG** wurden vergleichbare *cac*-Werte mit 1.5×10^{-7} mol/L und 1.4×10^{-7} mol/L bestimmt. **Pep₁-PEG**, welches eine vergleichbare Anzahl an hydrophoben Aminosäuren wie **Pep₃-PEG** aufweist, zeigte mit 2.1×10^{-7} mol/L einen leicht erhöhten *cac*-Wert. Dies lässt sich auf die fehlenden aromatischen Phenylalanine zurückführen, welche über π - π -Wechselwirkungen die *cac* senken können. Damit bewegen sich die *cac*-Werte in der Größenordnung von anderen amphiphilen Blockcopolymeren und sollten gegenüber Verdünnungen, z. B. im Blut, recht stabil sein.⁵⁸⁻⁵⁹ Da sich die *cac*-Werte der einzelnen Konjugate in einer vergleichbaren Größenordnung befinden und alle Solubisierungsexperimente (und auch spätere Freisetzungsexperimente) bei höheren Konjugatkonzentrationen als deren *cac* durchgeführt wurden, kann angenommen werden, dass Unterschiede in der Wirkstoffsolubilisierung auf spezifische Peptid/Wirkstoff-Interaktionen und nicht auf Aggregatbildungseigenschaften zurückgeführt werden können.

3.3 Wirkstofffreisetzung der Konjugate

Im Rahmen der Screening-Methode konnten nicht nur gute Binder identifiziert, sondern auch die Freisetzungseigenschaften gegenüber BSA bestimmt werden. Die Freisetzungseigenschaften der mit Wirkstoff beladenen Peptid-Polymer-Konjugate sollen im Folgenden mit fluoreszenzbasierten Methoden untersucht werden. Es wurde auf die voneinander unabhängigen Methodiken der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Fluoreszenzanisotropie (FA) zurückgegriffen, um Einblicke in die Transsolubilisierungskinetiken von BB17 an BSA zu erhalten.

Die FCS ist eine optische Messmethode, die auf der Detektion von Fluoreszenzintensitätsfluktuation von Fluorophoren in verdünnter Lösung basiert und daraus Informationen über die Diffusionsgeschwindigkeiten gewinnt.ⁱⁱⁱ Hierbei wird mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops in einer Probenkammer ein möglichst kleines Volumen mit Anregungslicht bestrahlt. Diffundieren nun mit BB17 beladene Peptid-Polymer-Konjugate durch das Anregungsvolumen, werden diese angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht. Durch die Fluktuation der Intensitäten des Fluoreszenzlichts können anschließend die Diffusionszeiten der einzelnen Fluorophore ermittelt werden. Dabei sollten die Fluorophore als Teil der Peptid-Polymer-Konjugate aufgrund der Größe langsamer diffundieren als BSA/BB17 (Abbildung 23, a). Dies wurde in Einkomponentenmessungen bestätigt, bei denen mittlere Diffusionszeiten und hydrodynamische Radien von **Pep₁-PEG/BB17** von $D \approx 3900 \mu\text{s}$ ($R_h = 81 \pm 20 \text{ nm}$), **Pep₂-PEG/BB17** von $D \approx 2700 \mu\text{s}$ ($R_h = 50 \pm 12 \text{ nm}$) und **Pep₃-PEG/BB17** von $D \approx 1900 \mu\text{s}$ ($R_h = 34 \pm 12 \text{ nm}$) bestimmt wurden. BSA/BB17 zeigte wie erwartet mit $D \approx 200 \mu\text{s}$ ($R_h = 3.6 \pm 0.6 \text{ nm}$) deutlich geringe Diffusionszeiten. Die hydrodynamischen Radien überschreiten hierbei die DLS-Ergebnisse leicht, was sich auf Ungenauigkeiten bei der Größenabschätzung der Probenkammer zurückführen lässt, jedoch korrelieren die Ergebnisse untereinander gut. Für die Freisetzungsexperimente wurden die beladenen Konjugate mit einem Äquivalent BSA (bezogen auf BB17) versetzt und für 2 h

ⁱⁱⁱ Die FCS-Messungen wurden in Kooperation mit CLAUDIA DONTI der Universität Bayreuth, Arbeitskreis Prof. WEISS, Experimentale Physik I, durchgeführt.

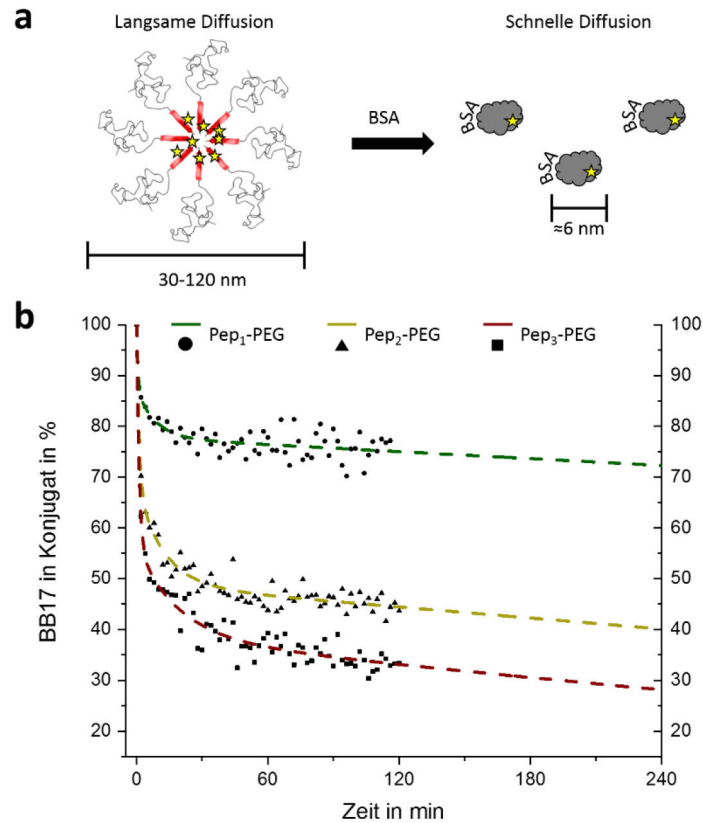


Abbildung 23. Funktionsprinzipien der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (a) und Messungen von Pep₁₋₃-PEG nach Zugabe von einem Äquivalent BSA (bezogen auf BB17). Symbole repräsentieren gemessene Werte, Linien gefittete und extrapolierte Werte (b).

vermessen (Abbildung 23, b). Wie erwartet zeigte **Pep₁-PEG** die langsamste Freisetzungskinetik mit einer Freisetzung von ≈ 28 % BB17 nach 4 h (für Berechnungsgrundlage siehe Kapitel 5.12). Im Vergleich dazu setzte **Pep₃-PEG** über 70 % BB17 nach 4 h an BSA frei und zeigte damit deutlich schnellere Freisetzungskinetiken. **Pep₂-PEG** befand sich mit 40 % übertragenem BB17 nach 4 h zwischen **Pep₁-PEG** und **Pep₃-PEG** und bestätigt damit die aus dem Screening gewonnen Informationen. Besonders effizient scheint die Wirkstofffreisetzung in den ersten 15 min nach Zugabe von BSA zu sein. Hierbei gab **Pep₁-PEG** ca. 20 % BB17 frei, während **Pep₃-PEG** bereits 53 % übertrug. Somit lässt sich eine initial schnelle Freisetzung beobachten, bis sich ein Freisetzungsgleichgewicht einstellt. Bei keinem der Systeme wurde innerhalb der 4-stündigen Messung ein vollständiger Transfer von BB17 auf freies BSA beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre die Eingliederung von BSA in den Aggregat, bei der BB17 zwar auf BSA übergeht, jedoch das Aggregat nicht verlässt. Kryo-TEM Messungen der beladenen Konjugate vor und nach Zugabe von BSA unterstützen diese These (siehe 5.13, Abbildung 51). Dort wurden Vergrößerungen der Aggregate nach BSA

Zugabe von 60 % beobachtet, die auf eine mögliche Eingliederung von BSA zurückzuführen ist. Dabei zeigen die Fluorophore trotz Transfer zu BSA langsame Diffusionszeiten, womit eine quantitative Aussage über die Freisetzung nicht möglich ist. Diese Ergebnisse stehen in vollständiger Übereinstimmung mit dem aktuellen Transsolubilisationsmodell, bei dem ein Transfer von wasserunlöslichen Wirkstoffen an der Peptid/PEG Grenzfläche bei BSA Kollision stattfindet.⁸⁸

Zur weiteren Untersuchung der Wirkstofffreisetzung wurde auf die Fluoreszenzanisotropie zurückgegriffen. Diese misst die Rotation der Fluorophore in Lösung, indem sie Änderungen des Polarisierungsgrades von emittiertem Fluoreszenzlicht misst. Dazu wurden die mit BB17 beladenen Konjugate mit polarisiertem Licht einer Wellenlänge von 472 ± 20 nm angeregt und die Polarisation des Fluoreszenzlichts bei 662 ± 20 nm vermessen, was den Fluoreszenzeigenschaften von BB17 entspricht. Generell weisen dabei schnell rotierende Fluorophore eine geringe Anisotropie auf, da sich innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit die Ausrichtung der Fluorophore statistisch verteilt und das Fluoreszenzlicht damit vollständig depolarisiert emittiert wird. Im Vergleich dazu strahlen langsam rotierende Fluorophore stark polarisiertes Licht aus, womit diese eine hohe Anisotropie ($A \leq 0.4$) aufweisen. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um zu überprüfen, ob ein Fluorophor im freien oder gebundenen Zustand vorliegt, da die Rotationsgeschwindigkeit des Fluorophors dem des gesamten Bindeystems entspricht.

Abbildung 24 zeigt die mit BB17 beladenen Konjugate vor und während der Wirkstofffreisetzung gegenüber BSA. Dabei wurden vor Zugabe von BSA Fluoreszenzanisotropien von $A \leq 0.1$ für die mit BB17 beladenen Konjugate beobachtet. Dabei gilt zu erwähnen, dass in Abbildung 24 **Pep₁-Spacer-PEG** ($A_{\text{Start}} = 0.09$) und **Pep₃-Spacer-PEG** ($A_{\text{Start}} = 0.04$) für eine bessere Vergleichbarkeit der Freisetzungseigenschaften auf $A_{\text{Start}} = 0.075$ normiert wurden. Nach Zugabe von BSA nähern sich die Proben mit unterschiedlicher Geschwindigkeit einem Wert von $A \approx 0.32 - 0.27$ an, der im experimentellen Fehler von reinem, mit BB17 beladenen BSA liegt ($A \approx 0.3$). In Hinblick auf die Größe der einzelnen Systeme (R_h (Konjugat) ≥ 16 nm vs. R_h (BSA) ≈ 3 nm) sollte ein Transfer des Wirkstoffes von großen Konjugaten zu kleineren BSA-Molekülen mit einer Senkung der Anisotropie einhergehen, und

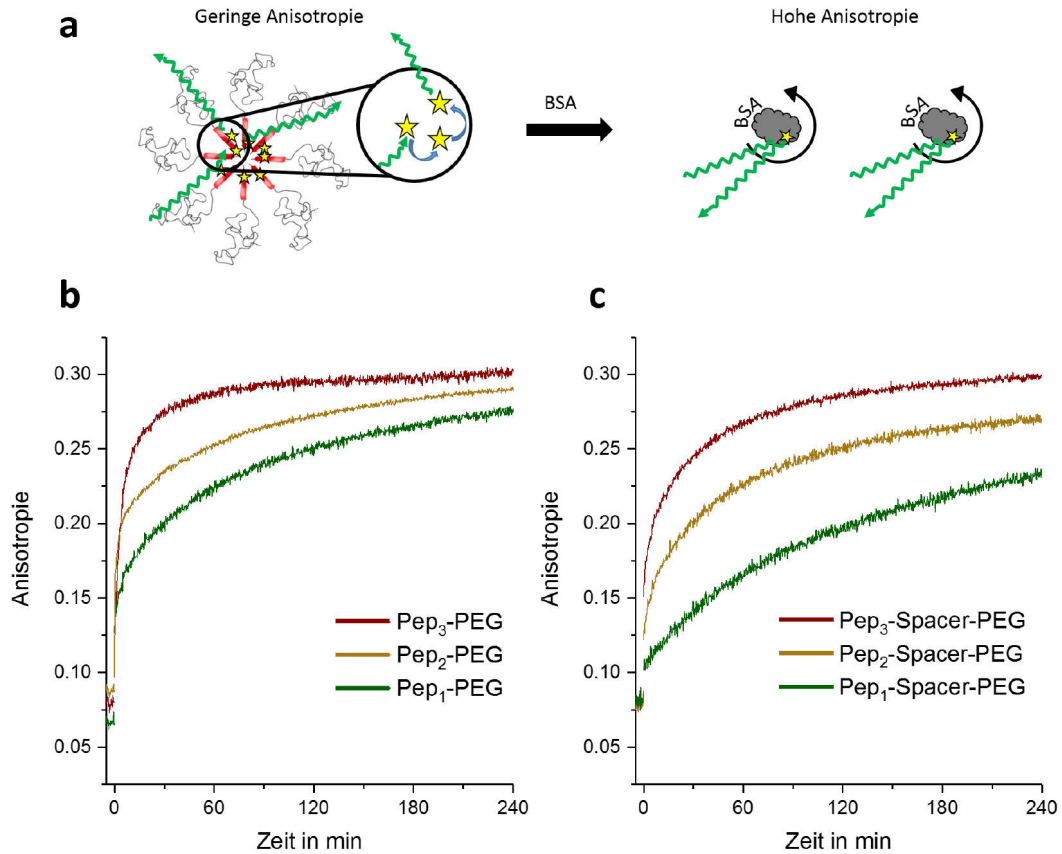


Abbildung 24. Funktionsprinzipien der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (a) und Messungen der **Pep₁₋₃-PEG** (b) und **Pep₁₋₃-Spacer-PEG** (c) nach Zugabe von BSA, durch eine Lücke im Spektrum gekennzeichnet, zum Zeitpunkt $t = 0$ min. **Pep₃-Spacer-PEG** und **Pep₁-Spacer-PEG** wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf einen Startwert von $A = 0.075$ normiert.

nicht, wie beobachtet, mit einem deutlichen Anstieg. Dieser Effekt kann jedoch durch die Packungsdichte der Fluorophore in den Konjugaten erklärt werden: Dabei finden strahlungsfreie Übergänge (eng. *Radiationless Energy Transfer*, RET-Effekt) zwischen den einzelnen Fluorophoren statt, die für eine Depolarisation des emittierten Fluoreszenzlichts sorgen. Die Abstände der einzelnen Fluorophore betragen dabei Größenordnungen von ≈ 10 nm und befinden sich in einer stochastisch verteilten Anordnung.¹⁶⁴⁻¹⁶⁵ Durch den Übergang zu BSA werden diese Fluorophore vereinzelt, womit RET-Effekte nicht mehr möglich sind. Das Fluorophor erfährt anschließend nur die Rotationsgeschwindigkeit von BSA und emittiert somit polarisiertes Fluoreszenzlicht, wodurch die Anisotropie steigt.

Ähnlich wie bei den FCS Messungen konnte bei allen Konjugaten eine initiale schnelle Wirkstofffreisetzung beobachtet werden. Um die Freisetzungseigenschaften zu vergleichen, wurden die t_{80} -Zeiten der Konjugate bestimmt. Diese geben an, zu welchem Zeitpunkt 80 % des Wirkstoffes auf BSA transferiert worden ist (Tabelle 3). Dabei zeigte sich, wie erwartet, ein deutlicher Trend in den Freisetzungseigenschaften. Während der *Keeper*

Pep₁-PEG mit $t_{80} = 140$ min den Wirkstoff langsam freigab, zeigte der *Releaser* **Pep₃-PEG** mit $t_{80} = 10$ min eine deutlich schnellere Übertragung auf BSA. **Pep₂-PEG** als *medium Releaser* befindet sich mit $t_{80} = 65$ min erneut zwischen dem *Keeper* und *Releaser*.

Tabelle 3. Durch Fluoreszenz Anisotropie ermittelte t_{80} -Zeiten der beladenen Konjugate.

Peptid-Polymer-Konjugat	t_{80} in min	Peptid-Polymer-Konjugat	t_{80} in min
Pep₁-PEG (<i>Keeper</i>)	140	Pep₁-Spacer-PEG	350
Pep₂-PEG (<i>m. Releaser</i>)	65	Pep₂-Spacer-PEG	130
Pep₃-PEG (<i>Releaser</i>)	10	Pep₃-Spacer-PEG	37

Dieser Trend war auch bei den *14meren* **Pep₁₋₃-Spacer-PEG** zu beobachten: So benötigte **Pep₁-Spacer-PEG** 10-fach so lange zum Erreichen der 80 % Freisetzung als **Pep₃-Spacer-PEG** (350 min vs. 37 min). Generell transferierten die *14mere* den Wirkstoff deutlich langsamer an BSA als die entsprechenden *7mere*. Dies lässt sich auf eine bessere Abschirmung der Wirkstoffe im Inneren der *14mere* durch die zusätzliche Spacereinheit zurückführen, womit BSA-Kollisionen seltener in einem Wirkstofftransfer resultieren. Im Gegensatz zur FCS nähern sich in der Fluoreszenzanisotropie alle Freisetzungskinetiken einem Grenzwert von $A \approx 0.3$ an, was einen kompletten Transfer von BB17 auf BSA indiziert. Dabei ergänzen sich die Ergebnisse der FCS und FA und bestätigen die Annahme, dass BSA teilweise im Aggregat gebunden wird. Während dies in der FCS als nicht freigesetzter Wirkstoff erkannt wird, zeigt die Fluoreszenzanisotropie durch die Separierung und Reduzierung der RET-Effekte der Wirkstoffe einen Übergang an BSA an.

Ebenfalls wurden Referenzmessungen mit dem etablierten, nicht-ionischen Löslichkeitsvermittler Kolliphor EL durchgeführt (vgl. 2.2). Dieses auf PEGyliertem Rizinusöl basierende Tensid wird in der Medizin häufig für Solubilisierung von Wirkstoffen genutzt und stellt damit ein geeignetes Referenzsystem dar. Die maximale Wirkstoffaufnahme beträgt 1:1.8 (mmol BB17/mmol Additiv). Dieser Wert scheint bemerkenswert, da vergleichsweise kleine *7mer* Peptide, welche nur ca. 20 % der Gesamtmasse eines Konjugats ausmachen, effektiv Wirkstoff binden können. Verglichen damit bindet Kolliphor EL mit 40 % hydrophobem Anteil den Wirkstoff nur doppelt so gut. In Wirkstofffreisetzungstests mittels

Fluoreszenzanisotropie zeigte mit BB17 beladenes Kolliphor EL keine Wirkstofffreisetzung (siehe 5.12). Dies lässt sich vermutlich auf die starken hydrophoben Interaktionen zwischen dem Wirkstoff und der aliphatischen Struktur der Rizinusöleinheit des Kolliphor EL zurückführen, welche eine Wirkstofffreisetzung verhindert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Vorteile der Peptid-PEG-Strategie, bei der sich Freisetzungseigenschaften genau den Anforderungen der Therapeutika anpassen lassen.

Um weitere Einblicke in die Sequenzeinflüsse auf die Wirkstoffbindung und Freisetzungseigenschaften zu erhalten, wurden Alanin-Scans von **Pep₁₋₃-PEG** durchgeführt, bei denen einzelne Aminosäuren entlang der Peptidsequenzen mit dem leicht unpolaren Alanin ausgetauscht wurden (Abbildung 25). Dabei wurde beobachtet, dass der Austausch von po-

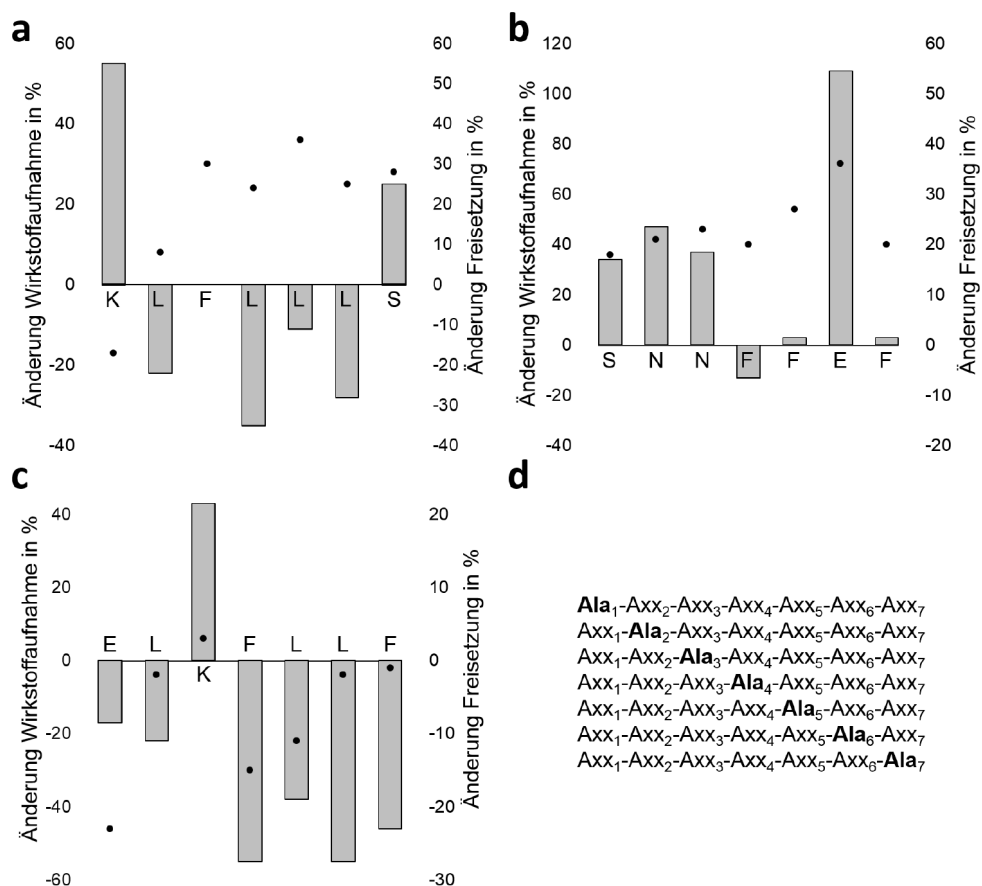


Abbildung 25. Alanin-Scan der Konjugate Pep₁-PEG (a), Pep₂-PEG (b) und Pep₃-PEG (c) und der Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme und die Freisetzungskinetiken. Balken zeigen die Änderungen in den Wirkstoffaufnahmen relativ zur unmodifizierten Sequenz an (linke y-Achse) und Punkte die Änderungen in den Freisetzungskinetiken relativ zur unmodifizierten Sequenz an (rechte y-Achse). Generelles Schema eines Alanin-Scans (d).

laren Aminosäuren durch Alanin zu einer verstärkten Wirkstoffaufnahme führt, wohingegen der Austausch von stark hydrophoben Aminosäuren in einer leichten Reduktion der Aufnahmefähigkeit resultiert. Es zeigte sich, dass die Wirkstoffaufnahme wie erwartet eine komplexe Abhängigkeit von der Position der entsprechenden Aminosäuren hat.⁹⁰ **Pep₁-PEG** zeigte beim Austausch von Lys2 oder Ser2 einen deutlichen Anstieg der Wirkstoffaufnahme von bis zu 50 %, der auf der Erweiterung des hydrophoben Segments auf sechs Aminosäuren beruht (ALFLLL, LFLLLA). Ein Austausch von Leu reduziert die Wirkstoffaufnahme um 10 - 35 % und folgt der Abnahme der Hydrophobie. Während der Effekt bei Leu6 und Leu4 mit -30 % ausgeprägt war, zeigte Leu5 nur eine geringe Veränderung (-10 %). Interessanterweise zeigte der Austausch von Phe3 keine Änderung der Beladungsfähigkeit. Auch bei **Pep₂-PEG** zeigte der Austausch der polaren Aminosäuren Ser1 und Asn2-3 einen Anstieg der Beladungsfähigkeit von 45 %. Der stärkste Effekt wurde jedoch bei dem Austausch von Glu3 beobachtet, der in einer Verdopplung der Wirkstoffaufnahme resultierte (+110 %). Dies kann durch die Bildung eines ausgedehnten hydrophoben Blocks (FFAF) erklärt werden, wobei die Beladungskapazitäten vergleichbar mit **Pep₁-PEG** waren. **Pep₃-PEG** zeigte nur bei einem Austausch von Lys3 einen positiven Effekt von +40 %, wohingegen der Austausch von Glu1 sogar in einer Abnahme der Kapazität von -15 % resultierte. Der Austausch der anderen hydrophoben Aminosäuren verursachte je nach Position leichte Abnahmen der Beladungsfähigkeit, was die Relevanz der Aminosäureposition für eine Wirkstoffbindung unterstreicht. Auffällig ist, dass die Bildung ausgedehnter Blöcke hydrophober Aminosäuren oft einen positiven Effekt auf die Beladungskapazitäten hat. Jedoch trifft dies nicht auf alle Sequenzen zu: So konnte bei **Pep₃-PEG** trotz Vergrößerung des hydrophoben Blocks durch Austausch der N-terminalen Glutaminsäure ein Rückgang der Beladungskapazität beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Bindung des Wirkstoffes komplex ist und Beladungskapazitäten nicht einfach durch die Summe der hydrophoben Aminosäuren bestimmt werden, was bei dem Design von Wirkstofftransportern beachtet werden muss.

In Fluoreszenzanisotropiestudien wurden die Pep-PEG Konjugate der Alanin-Scans auf die Wirkstofffreisetzungskinetiken hin untersucht. Für einen direkten Vergleich der Konjugate wurde die freigesetzte Wirkstoffmenge nach 15 min bestimmt. Dabei zeigte sich bei **Pep₁-PEG**, dass der Austausch von Lys1 aufgrund der Vergrößerung des hydrophoben Blocks (ALFLLL) und einer damit einhergehenden Konzentration des Wirkstoffes im Aggregatkern zu einer verlangsamten Freisetzung führte. Im Vergleich dazu sorgte der Austausch des direkt an der Peptid/PEG Grenzfläche gelegenen Ser7 vermutlich für eine leichtere Andockung des Wirkstoffes im Grenzflächenbereich und dadurch zu einer schnelleren Freisetzung. Dieser Effekt wurde ebenfalls bei **Pep₂-PEG** beobachtet, bei dem der Wirkstoff des Konjugats SNNFFAF nicht vor BSA geschützt werden konnte. Durch Störung des Bindemotivs FLLF in **Pep₃-PEG** wurden sowohl die Beladungsfähigkeit, als auch die Freisetzungskinetiken reduziert. Hierbei kann eine geringere Wirkstoffkonzentration in der Peptid/PEG Grenzfläche angenommen werden, die zu einer besseren Abschirmung des Wirkstoffes führt. Durch den Austausch von Lys3 wurde ein hydrophober Block geformt, bei dem der Wirkstoff in der Grenzfläche dominiert, wodurch die Freisetzungskinetiken ebenfalls erhöht sind. Damit unterscheidet sich der Austausch von Lys3 stark von dem Austausch von Glu1, welches den Wirkstoff im Kern des Aggregats konzentriert und damit besser abschirmt.

Die Ergebnisse der Beladungs- und Freisetzungsexperimente deuten darauf hin, dass für eine gute Wirkstoffbeladung primär hydrophobe Blöcke benötigt werden. Dabei wirken sich die Positionen dieser Blöcke in den Peptidsequenzen nur gering auf die Beladungskapazitäten aus, sind für die Freisetzungskinetiken jedoch entscheidend. Es konnte gezeigt werden, dass eine Zentrierung des Wirkstoffes im Kern der Aggregate langsame Freisetzungen, eine Lagerung an der Grenzfläche hingegen schnelle Freisetzungen verursacht. Somit lassen sich die Systems gut für entsprechende Anwendungen definiert einstellen. Weiterhin bestätigen diese Experimente, dass die Beladungskapazitäten und Freisetzungskinetiken stark von der Art und Position der Aminosäuren abhängen.

3.4 Entwicklung einer fragmentierungsfreien Screening-Methode

Auch wenn das *de novo* Sequenzieren von Peptiden zur Sequenzidentifikation gute Ergebnisse brachte, ist diese Methode vor allem für kurze Sequenzen nur teilweise geeignet.¹⁶⁶ Dies liegt höchstwahrscheinlich an der mit Schwierigkeiten verbundenen Interpretation der durch CID generierten Fragmentspektren, die durch eine Vielzahl an Spaltungsmechanismen der Peptide zumeist komplex sind. So wurden in den letzten Jahren immer wieder neue Spaltungsmechanismen von Peptiden beobachtet, die die Spektren weiter verkomplizieren.¹⁶⁷⁻¹⁷¹ Eine erfolgreiche *de novo* Sequenzierung erfordert zudem eine vollständige Abdeckung des Sequenzbereiches bei der Fragmentierung, was nur mit einer hohen Qualität der Messungen einhergeht. Aufgrund der erhöhten Fehleranfälligkeit bei der Sequenzidentifikation wurden Alternativsysteme entwickelt, die auf das Fragmentieren der Peptide verzichten. Eine interessante Alternative sind hierbei die Leiterbibliotheken. Diese werden ebenfalls über einen *Split&Mix* Ansatz entwickelt, wobei bei jeder erneuten Kupplung einer Aminosäure ein geringer Prozentsatz an *Scavengern* (aus dem Englischen: Stoppermoleküle) zur Kupplungslösung hinzugegeben wird (Abbildung 26). Diese sorgen dafür, dass an der Festphase definierte Abbruchsequenzen entstehen, welche nach Abspalten der Peptidsequenzen mittels MALDI- bzw. ESI-MS untersucht werden können. Hierbei kann durch den Abstand der detektierten Abbruchsequenzen direkt auf die Sequenz geschlossen werden ohne das Molekül zu fragmentieren. Diese Methodik ist sowohl zeitsparend, als auch auf einfachere, nicht Tandem-MS-fähige Systeme übertragbar.

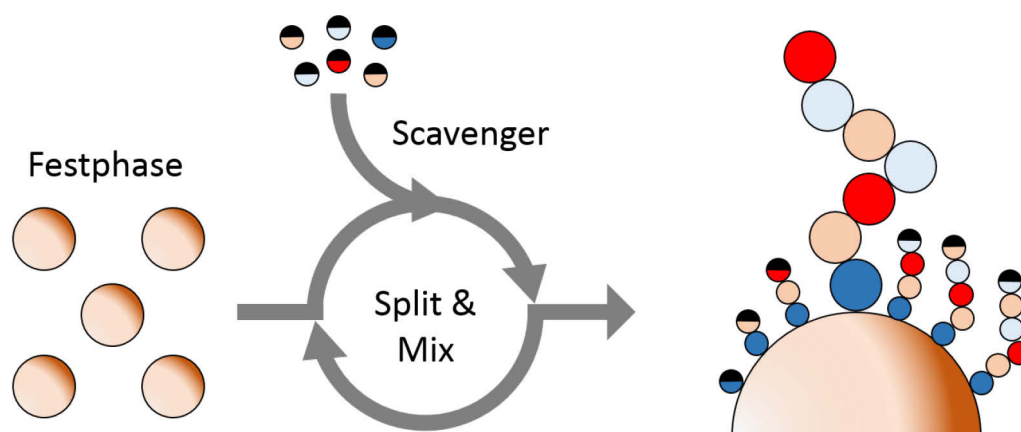


Abbildung 26. Genereller Ansatz der Leiterbibliothekensynthese. Die Synthese basiert auf der *Split&Mix* Methodik, wobei bei jedem neuen Kupplungsschritt eine definierte Menge an *Scavenger* hinzugegeben wird, um definierte Abbruchsequenzen zu erzeugen. Dies ermöglicht eine fragmentierungsfreie Identifikation der Peptidsequenz.

Als *Scavenger* wurde meist bis zu 10 % acetyliertes Alanin pro Kupplungsschritt verwendet, sodass die Abbruchsequenzen einen erheblichen Anteil an der finalen Polymerkomposition haben.¹⁷² Bei einer 7mer Peptidbibliothek entspricht dies bereits einem absoluten Anteil an Abbruchsequenzen von > 50 %. Dies ist insbesondere für Wirkstoffscreenings nicht akzeptabel, da z. B. bereits kurze hydrophobe Abbruchsequenzen die Gesamtwirkstoffadsorption der Harzkugel beeinflussen können. Es musste daher ein System etabliert werden, welches Abbruchsequenzen so definiert einfügt, dass der Anteil an vollständiger Peptidsequenz an der Festphase möglichst hoch ist.

3.4.1 Design der Leiterbibliothek

Zur Erzeugung der definierten Abbruchsequenzen in der Bibliothek **Bib3** sollten *Scavenger* gewählt werden, die ähnliche Reaktionskinetiken wie die zur Synthese verwendeten Fmoc-Aminosäuren (Asn, Glu, Gly, Leu, Lys, Phe, Ser) aufweisen. Dabei bieten sich die entsprechenden Boc-geschützten Aminosäuren an, da diese zumeist durch gleiche Seitenkettenschutzgruppen geschützt sind und damit strukturell den Fmoc-Aminosäuren ähnlich sind.¹⁷³ Weiterhin werden durch das Einführen der Boc-geschützten Aminosäuren keine neuen Funktionalitäten eingeführt, wie es z. B. bei acetyliertem Alanin der Fall wäre. Um in einem Probesystem die Reaktionskinetiken der Fmoc- und Boc-Aminosäuren zu überprüfen, wurde ein Rink-Amid-Harz auf sieben Reaktoren aufgeteilt, mit 20 % Piperidin in NMP die Fmoc-Schutzgruppen entfernt und die spezifische 9-Dibenzofulven-Piperidin-Addukt Stoffmenge in den Lösungen bestimmt. Anschließend wurde jeder Reaktor

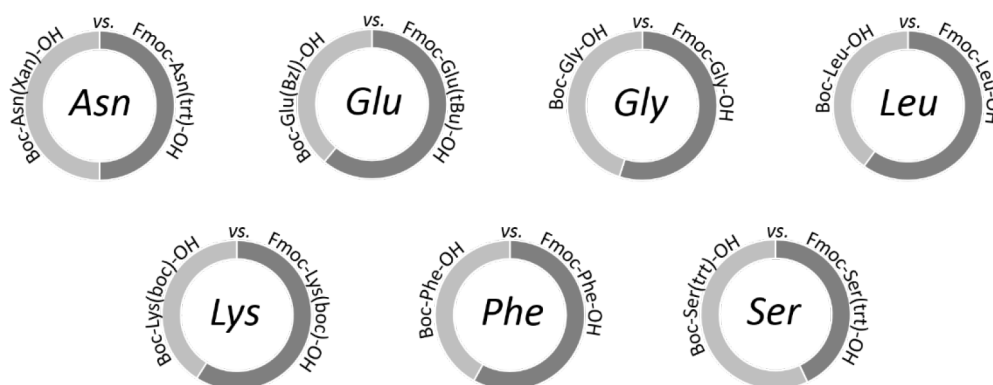


Abbildung 27. Vergleich der Kupplungsverhältnisse bei Zugabe einer 1:1 Mischung der jeweiligen Fmoc-/Boc-Aminosäuren. Die Aminosäuren Asparagin und Glutaminsäure wiesen dabei für die jeweiligen Spezies unterschiedliche Seitenschutzgruppen auf.

mit einer 1:1 Mischungen der Fmoc-Aminosäure und der entsprechenden Boc-Aminosäure gekuppelt. Nach erneuter Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe konnten nun Kupplungsverhältnisse der verschiedenen Aminosäuren bestimmt werden. Abgesehen von Serin und Asparagin zeigten bei allen Kupplungen die Fmoc-Aminosäuren tendenziell höhere Kupplungswerte (Abbildung 27). Die Abweichung vom optimalen 1:1 Verhältnis ist jedoch gering, weshalb diese auch auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden kann. Interessanterweise scheinen unterschiedliche Seitenkettenschutzgruppen der Fmoc- und Boc-Aminosäuren, wie bei Asparagin und Glutaminsäure, eine untergeordnete Rolle bei der Kupplung zu spielen. Dies kann durch die räumliche Entfernung der Schutzgruppen von den reaktiven Zentren begründet werden, womit z. B. sterische Effekte kaum einen Einfluss haben. Durch die ähnlichen Reaktivitäten der Fmoc- und Boc-Aminosäuren kann demnach die vorgeschlagene *Scavenger*-Strategie verfolgt werden.

Da diese Methode auf die Fragmentierung zur Sequenzierung der Peptide verzichtet, kann auf die für **Bib2** entwickelte Spacereinheit GGTERSG verzichtet werden. Dies ist sinnvoll, da diese, wie in dem Screening von **Bib2** beobachtet, einen gewissen Einfluss auf Beladungskapazitäten zeigt. Da fragmentierungsfreie MALDI-MS-Messungen jedoch erst ab ca. m/z 500 umgesetzt werden können, musste ebenfalls eine Spacersequenz implementiert werden. Die Wahl fiel auf einen Mini-PEG Linker (mPEG), welcher die hydrophilen Eigenschaften der Festphase fortführt und dementsprechend in Wirkstoffscreenings keine Interaktion zeigt. Zur Überprüfung der Durchführbarkeit wurde das Peptid LGLSLLE(mPEG)₃ an einem mit einem Photolinker ausgestatteten ChemMatrix®-Harz gekuppelt. Dabei sollte die kleinste Abbruchsequenz E(mPEG)₃ mit einer Masse von 852.44 Da detektierbar sein, womit sich alle Peptidsequenzen in einem geeigneten Messbereich befinden. Zur Erzeugung der Abbruchsequenzen wurden den Aminosäurekupplungen 3 % der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäuren zugegeben. Die Reduzierung des Beladungsgrades war dabei während der Synthese deutlich über die Fmoc-Abspaltung erkennbar, bei der die 9-Dibenzofulven-Piperidin-Addukt Stoffmenge pro Kupplungsschritt um ca. 3 % sank. Die MALDI-ToF-MS-Messungen im positiv-Modus

zeigten wie erwartet leiterähnliche Spektren, bei denen die einzelnen Signale den Abbruchsequenzen zugewiesen werden konnten (Abbildung 28). Einzig die Abbruchsequenz E(mPEG)₃ zeigte geringe Intensitäten, was möglicherweise an einer schlechten Desorption durch die negative Ladung der Glutaminsäure liegt. Weiterhin waren die Natrium- und Kaliumaddukte stark ausgeprägt. Generell kann eine erfolgreiche Identifizierung allerdings auch durchgeführt werden, wenn nicht eindeutig erkennbar ist, ob es sich bei den Signalen um Proton-/Natrium- oder Kaliumaddukte handelt, da nur der Abstand der einzelnen Signale zueinander für die Identifizierung entscheidend ist. Ebenfalls wurden MALDI-Messungen direkt auf der mit UV-Licht behandelten Festphase durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.2), jedoch wurde nur ein starkes Signalausrauschen detektiert, wodurch keine der erwarteten Sequenzen identifiziert werden konnte. Dies lässt sich wie bei **Bib2**

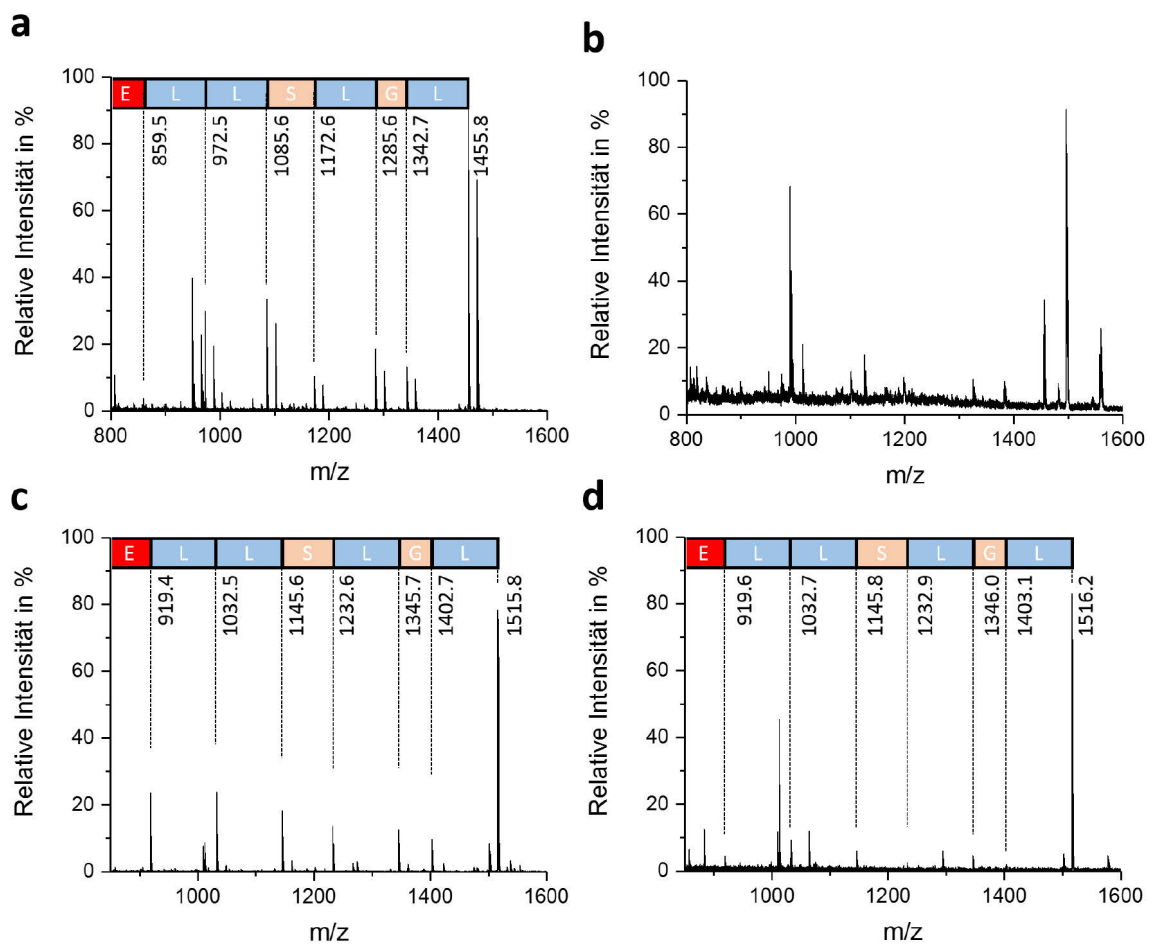


Abbildung 28. MALDI-ToF-MS-Spektren von Abbruchsequenzenpeptid LGLSLLE(mPEG)₃ (a) nach Abspalten von der festen Phase und (b) direkt auf der Harzoberfläche und Abbruchsequenzenpeptid LGLSLLE(mPEG)₂RR (c) nach Abspalten von der festen Phase und (d) direkt auf der Harzoberfläche. Die Signale bei m/z 952.5 und 1012.5 sind Nebenprodukte der Mini-PEG Linkerkupplung.

auf eine schlechte Ionisierung zurückführen. Um diese zu verbessern wurde ein ionisierungsverstärkendes Segment, bestehend aus zwei Argininen, eingebaut. Die Synthese von LGLSLLE(mPEG)₂RR erfolgte wie bereits beschrieben. Nach Entschützung wurden Messungen aus Lösung und auf der Harzoberfläche durchgeführt. Dabei wurden in Lösung deutlich bessere Signal-zu-Rausch Verhältnisse im Vergleich zu dem ersten Testpeptid erreicht. Es konnten alle Signale den erwarteten protonierten Sequenzen zugeordnet werden. Die Signale zeigten bei den einzelnen Sequenzen zu höheren Massen hin abnehmende Intensitäten. Dies kann auf die schlechtere Ionisierung längerer Sequenzen zurückgeführt werden. Auch die Messungen direkt auf der Oberfläche lieferten zufriedenstellende Ergebnisse und erlaubten eine Sequenzidentifikation. Interessanterweise wurde die in der ersten Messung kaum beobachtete kürzeste Sequenz E(mPEG)₂RR deutlich detektiert, was auf die zwei Arginine zurückgeführt werden kann, welche die negative Ladung an der Glutaminsäure ausgleichen.

Für die Bibliothekssynthese von **Bib3** wurde eine Strategie gewählt, die Stoffmenge der Abbruchsequenzen auf dem Syntheseharz konstant bei 3 % zu halten, womit mögliche Unterschiede in der Ionisierung aufgrund von Konzentrationsunterschieden reduziert werden. Dies erforderte eine schrittweise Erhöhung der verwendeten *Scavenger*-Menge von 3 % auf 3.8 % beim Fortschreiten der Kupplung. Für das randomisierte Peptidsegment wurden wie bereits bei **Bib2** die Aminosäuren Asn, Ser, Gly, Lys, Glu, Leu und Phe gewählt (Abbildung 29).

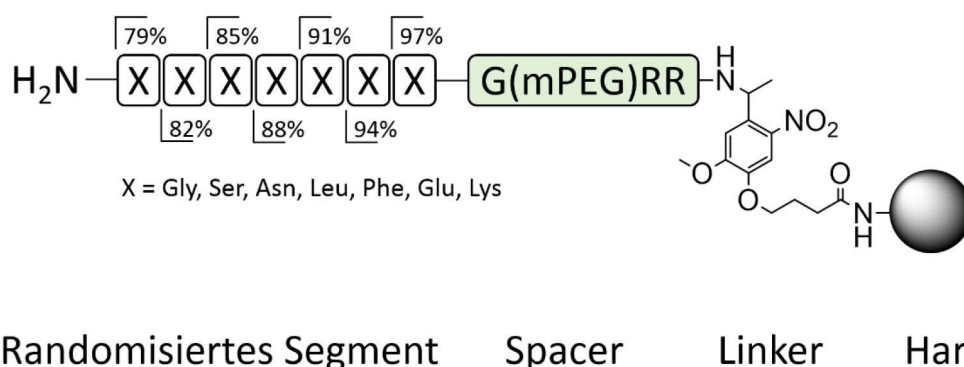


Abbildung 29. Aufbau der Leiterbibliothek **Bib3**, bei dem Boc-Aminosäuren als *Scavenger* genutzt wurden.

3.4.2 Vergleich der Leiterbibliotheken mit klassischer Fragmentierung

Um das Leiterbibliothekenkonzept mit der klassischen Fragmentierung zu vergleichen, wurden 36 Harzkügelchen der **Bib3** zufällig ausgewählt und separiert. Nach Abspaltung der Sequenzen wurden die Proben im MALDI-ToF-MS vermessen. Die erhaltenen Spektren wurden von der Spec2Seq-Software¹⁶³ (siehe 3.2.2) automatisch ausgelesen und den entsprechenden Sequenz zugewiesen. Für 24/36 Harzkügelchen konnten dabei alle Abbruchsequenzen identifiziert und damit eindeutige Sequenzidentifikationen erreicht werden. Für die restlichen 12/36 Harzkügelchen wurden jeweils 7/8 der möglichen Abbruchsequenzen erkannt, womit eine Erfolgsrate von 96 % erreicht wurde. Die durch fehlende Abbruchsequenzen entstandenen Lücken konnten jedoch der Kombination zweier Aminosäuren zugewiesen werden. Interessanterweise beinhalteten alle diese Kombinationen Glutaminsäure. Bei genauerer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass es sich bei den fehlenden Abbruchsequenzen um die *N*-terminale Glutaminsäure-Spezies handelte. Diese scheinen während des MALDI-Prozesses schlechter ionisierbar zu sein und erzeugen dadurch ein „Lücke“ im Sequenzspektrum. Somit kann eine Regel für die Sequenzierung von **Bib3** abgeleitet werden: Bei nicht-Detektieren einer Abbruchsequenz und gleichzeitigem Nachweis von Glutaminsäure als eine der fehlenden Aminosäuren

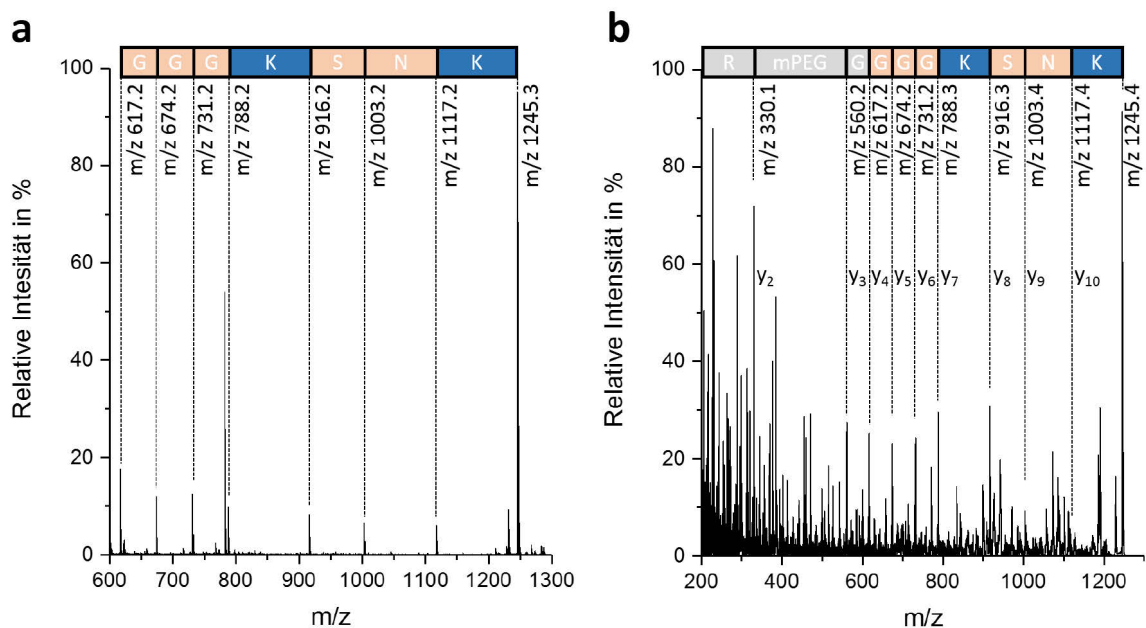


Abbildung 30. Vergleich der Abbruchsequenzenmethodik (a) und der Fragmentierung (b) anhand einer willkürlichen Harzkugel der Bibliothek **Bib3**. Zur besseren Visualisierung wurden in (b) die Intensitäten im Massebereich m/z 200-1200 30-fach vergrößert.

handelt es sich aller Voraussicht nach bei der fehlenden Abbruchsequenz um die N-terminale Glutaminsäure. Durch Anwendung dieser Regel konnten alle Sequenz eindeutig rekonstruiert werden. Anschließend wurde das Volllängenpeptid mittels Tandem-MS fragmentiert. Dabei wurden nur 5/36 (14 %) der Sequenzen vollständig erkannt. Zwar wurden 92 % der durch die Abbruchsequenzen bestimmten Aminosäuren aus den Fragmentenspektren erfolgreich ermittelt, jedoch täuscht dieser hohe Prozentsatz über den Fakt hinweg, dass von diesen 92 % nur etwas mehr als die Hälfte (ca. 55 %) der Aminosäuren einer richtigen Position im Peptid zugeordnet wurde. Häufig handelte es sich bei den falsch zugeordneten Positionen um zusammenhängende Aminosäuren, bei denen durch das Fehlen einzelner Fragmentensignale keine genaue Zuordnung erfolgen konnte. Hierbei gilt es jedoch zu erwähnen, dass den Peptiden, im Gegensatz zu **Bib2**, kein fragmentierungsverstärkender Spacer hinzugefügt wurde, da dieser für die Sequenzierung nicht notwendig ist. Dies führte zu verringerten Fragmentierungseigenschaften bzw. erhöhtem Signalrauschen und erschwerte damit einen direkten Vergleich. Dennoch wurden durch dieses Experiment die Stärken der Leiterbibliothekmethodik wie z. B. eindeutige Sequenzrekonstruktion im Vergleich zur klassischen Fragmentierung aufgezeigt (Abbildung 30).

Es zeigte sich, dass die fragmentierungsfreie Sequenzierung von Peptiden eine vielversprechende Alternative zur etablierten Fragmentierung darstellt. Auch bietet besonders der Wechsel von der langen, peptidischen Spacereinheit GGTERSG auf ein inertes Mini-PEG einen Vorteil für Wirkstoffscreenings, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen des Wirkstoffes mit dem Spacer unterdrückt werden können. Weiterhin setzen fragmentierungsfreie Sequenzierungen keine Tandem-MS-fähigen Geräte voraus.

3.4.3 Screening von BB17 gegen die Leiterbibliothek

Im Folgenden soll ein Screening von **Bib3** gegen BB17 durchgeführt werden. In einem Inkubationsexperiment wurden ebenfalls *Keeper*, *medium Releaser* und *Releaser* identifiziert (Abbildung 31). Dabei wurde für die *Keeper* 77 % hydrophobe und 18 % hydrophile Aminosäuren detektiert. Ähnlich wie bei dem Screening gegen **Bib2** war auch hier Phenylalanin mit ≥ 50 % die häufigste Aminosäure. Interessanterweise beinhalteten die *Keeper* ebenfalls geringe Mengen an Glutaminsäure (≈ 5 %), jedoch kein Lysin. Dies lässt

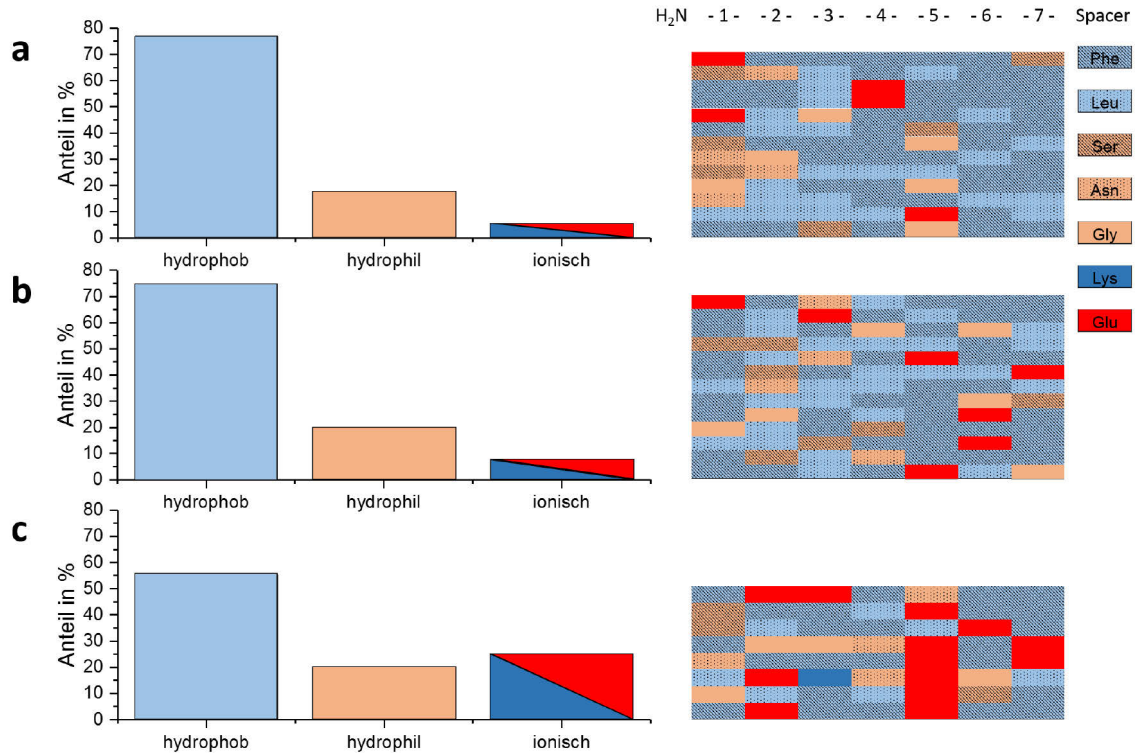


Abbildung 31. Ergebnisse des Screenings für *Keeper* (a), *medium Releaser* (b) und *Releaser* (c) mittels der Abbruchsequenzenmethodik. Links wurde der relative Anteil der Aminosäuren in den jeweiligen Sequenzkategorien aufgetragen, rechts sind die detektierten Sequenzen.

sich auf ionische Wechselwirkungen der Glutaminsäuren mit den ionisierungsverstärkenden Argininen zurückführen, die somit den Wirkstoff im Harz effektiv zurückhalten. Für die *medium Releaser* wurde ein hoher hydrophober Anteil ($\approx 75\%$) und ein, wie erwartet, gesteigener Anteil an ionischen Aminosäuren (7%) beobachtet. Ähnlich wie bei den *Keepers* wurde kein Lysin identifiziert. Die *Releaser* zeigten mit $\approx 55\%$ den geringsten hydrophoben Anteil, jedoch mit $\approx 30\%$ ein stark erhöhtes Vorkommen an ionischen Aminosäuren. Die Ergebnisse des Screenings gegen **Bib3** spiegeln damit ziemlich genau die Ergebnisse des Screenings der **Bib2** wider und bestätigen damit zum einen die bereits gefundenen Ergebnisse (siehe 3.2.2) und zum anderen die gesamte Screening-Methode. Da diese Sequenzen aus **Bib3** die bereits aus **Bib2** identifizierten doppeln, wurde im Folgenden nur mit **Pep₁₋₃-PEG** weitergearbeitet.

3.5 Entschlüsselung von binären Präzisionspolymeren

Um die Übertragbarkeit des fragmentierungsfreien Sequenzierens auf andere Systeme zu testen, wurde die Methode an Präzisionspolymeren getestet. Über diese Auslesemethode könnten sich Präzisionspolymerbibliotheken für Wirkstoffscreenings realisieren lassen, die aufgrund der chemischen Eigenschaften nicht durch Tandem-MS sequenziert werden können. Präzisionspolymere haben sich in den letzten Jahren durch einzigartige physikochemische und strukturelle Eigenschaften zu einer neuen Materialklasse entwickelt, die Anwendung als molekulare Informationsspeicher, molekulare Produktlabel oder Nachahmung von Biopolymeren wie DNA oder Peptiden finden könnte. Hierbei werden, vergleichbar mit Aminosäuren im Peptid, Präzisionspolymere schrittweise kontrolliert aufgebaut und Informationen oder spezielle Eigenschaften durch seitenkettenmodifizierte Monomere im Polymerrückgrat implementiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass z. B. Polyalkoxyaminamide, Polyphosphodiester und Polytriazolamide sequenzkontrolliert durch Festphasensynthese hergestellt und erfolgreich durch ESI/MALDI-Tandem-MS-Spektrometrie decodiert werden können. Für deren Synthesen wurden jeweils verschiedene Monomere genutzt, die als 0-bit und 1-bit definiert wurden und damit polymerbasierte Binärcodes darstellen. Momentan ist Tandem-MS das Mittel der Wahl um, die implementierten Codes in den Polymeren auszulesen. Auch wenn diese Methodik aufgrund

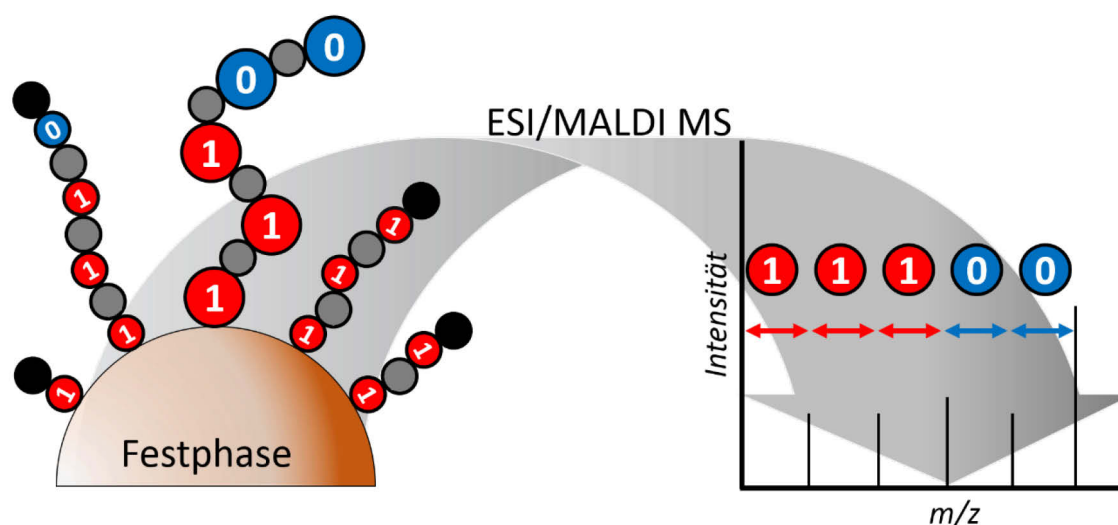


Abbildung 32. Allgemeiner Ansatz des fragmentierungsfreien Sequenzierens binär-codierter Präzisionspolymere.

von diversen Fragmentierungsarten oder Abwesenheit bestimmter Fragmente fehleranfällig ist, führt sie oft zur korrekten Sequenz.¹⁷⁴ Bei codierten Präzisionspolymeren, die chemisch instabilere Seitenketten als das Polymerrückgrat aufweisen, fragmentiert das Polymer primär an den Seitenketten, bevor Rückgratfragmentierung eintreten kann. Dies kann in einer kompletten Auslöschung der sequenzspezifischen Informationen resultieren, was ein Auslesen der Codes durch Massenspektrometrie unmöglich macht. Im Gegensatz dazu bietet die Methodik des fragmentierungsfreien Sequenzierens, wie bei der Peptidsequenzierung bereits beschrieben (siehe 3.4), eine schnelle und proben-, kosten- und zeitextensive Plattform, welche sich auf die Welt der Präzisionspolymere übertragen lässt (Abbildung 32).

3.5.1 Codierte Oligoalkoxyaminamide

Um die Anwendbarkeit des fragmentierungsfreien Sequenzierens auf Präzisionspolymere zu überprüfen, wurden auf molekularem Level codierte Präzisionspolymere mittels Abbruchsequenzenmethodik synthetisiert. Das erste *5mer* Präzisionspolymer (**PP1**) wurde hierbei durch eine chemoselektive Oligoalkoxyaminamid-Synthese, unter Nutzung zweier mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen ausgestatteter Bausteine, hergestellt^{iv} (Abbildung 33).¹⁷⁴ Dabei weist der erste Baustein ein nicht-cyclisches, symmetrisches Anhydrid und ein Alkylbromid auf, wohingegen der zweite Baustein ein Nitroxylradikal und ein primäres Amin aufweist. Als Festphase wurde ein Polystyrol basiertes Wang-Harz gewählt, welches mit einem peptidischen Spacer ausgestattet wurde. Analog zur **Bib3** wurde für den Spacer ein ionisierungsverstärkendes Segment in Form von zwei Lysinen gewählt, die während der Synthese durch eine temporäre Boc-Schutzgruppe maskiert waren. Es wurde sich bewusst gegen das ionisierungsverstärkende Arginin entschieden, da dessen stabile Pbf-Schutzgruppe erst bei hohen TFA-Konzentrationen abgespalten werden kann, die möglicherweise die Polymerstabilität beeinflussen. Zusätzlich wurden zwei Glycine für eine bessere sterische Erreichbarkeit für die Polymersynthese eingebaut.

^{iv} Die Oligoalkoxyaminamid-Synthese wurden in Kooperation mit CHLOÉ LAURE des Instituts Charles Sadron, Arbeitskreis Dr. habil. J.-F. LUTZ, Precision Macromolecular Chemistry, durchgeführt.

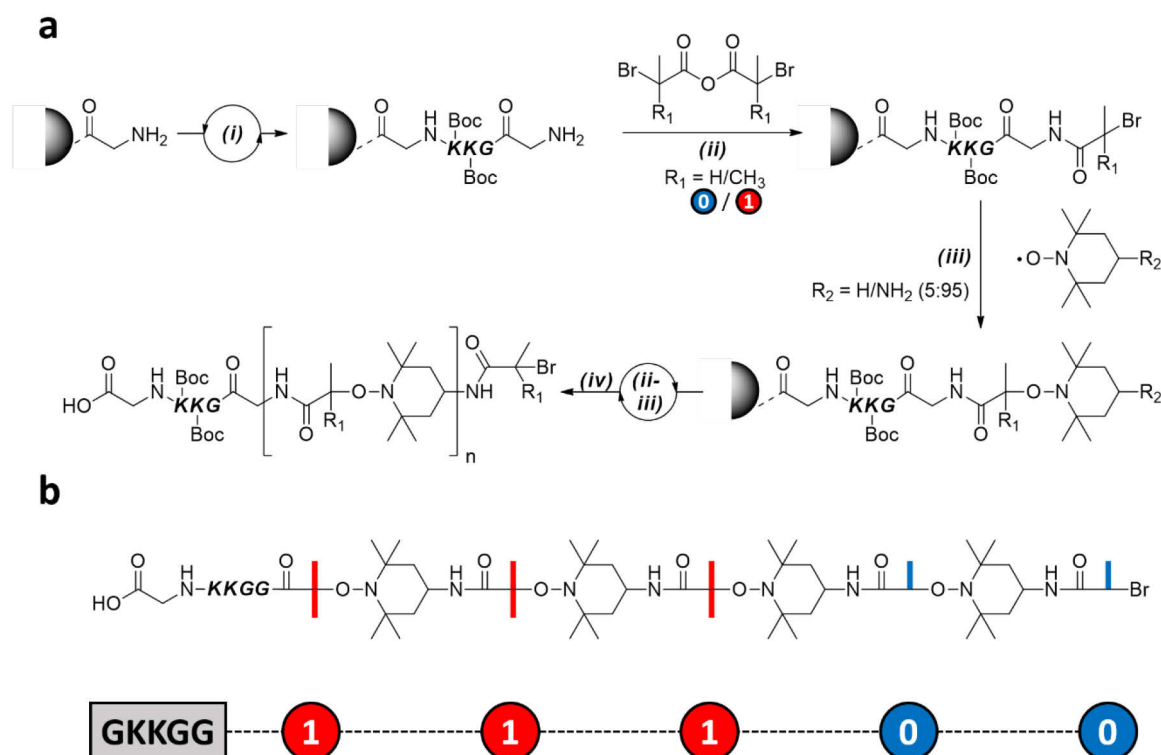


Abbildung 33. (a) Festphasensynthese des sequenzcodierten Oligo(alkoxyamin amid)s GKKGG11100 (b). Die Kupplung der peptidischen Spacereinheit basiert auf der Festphasenpeptidsynthese mit Acylierungsschritten (i). Reaktion eines symmetrischen, codierten Brom-funktionalisierten Anhydrids mit einem Amin (ii), Reaktion eines Amino-funktionalisierten Nitroxids mit einem *in situ* erzeugten Radikal, bei dem durch Hinzufügen von TEMPO definierte Abbruchsequenzen erzeugt werden (iii). Schritt (ii-iii) werden bis zur vollständigen Synthese von PP1 wiederholt. Abspaltung und Entschützung des Polymers wurde durch Behandlung mit TFA erreicht (iv).

In einem ersten Schritt wurde durch die Reaktion des Anhydrids mit dem freien Amin des *N*-terminalen Glycins ein *N*-substituiertes Amid geschaffen. Zur Implementierung des erwünschten Codes wurden die Synthone $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}(\text{CH}_3)-$, definiert als 0-Bit und $-\text{NH}(\text{CO})\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, definiert als 1-Bit, gewählt. Die beiden Synthone unterscheiden sich durch eine Methylgruppe (71.0 Da (0-Bit) *vs.* 85.1 Da (1-Bit)) und können daher in späteren massenspektrometrischen Messungen klar differenziert werden. Bei dem zweiten Schritt handelt es sich um die Kupplung eines durch kupferbasierten Atomtransfer geschaffenen Radikals mit einem Amino-funktionalisierten Nitroxid. Zur Erzeugung der definierten Abbruchsequenzen wurden dem Kupplungsschritt geringe Mengen eines *Scavengers* zugegeben. Um ähnliche Reaktionskinetiken und damit Kontrolle des Einbaus von *Scavenger* und dem Amino-funktionalisierten Nitroxid zu erreichen, wurde das strukturverwandte Nitroxid 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO) gewählt. Die Menge

an genutztem *Scavenger* betrug dabei 5 % an der gesamt genutzten Nitroxidmenge, was in einer signifikanten Menge an Abbruchsequenzen resultieren sollte. Diese beiden Kuppelungsschritte wurden bis zur Erreichung des vollständigen Präzisionspolymers abwechselnd wiederholt. Die fertige Polymermischung besteht damit theoretisch aus ca. 82 % vollständiger Sequenzen GKKGG11100 und 18 % Abbruchsequenzen. Das Abspalten vom Harz wurde mit 50 % TFA in DCM für 2 h erreicht, was zeitgleich eine Entschützung der Lysine bewirkte. Dabei wurden die Sequenzen C-terminal als freie Säuren erhalten. Die Polymermischung wurde anschließend nicht durch z. B. Fällern in Diethylether aufgereinigt, was einem Verlust kleinerer Abbruchsequenzen zur Folge haben könnte, sondern lediglich gefriergetrocknet. In MALDI-ToF-MS-Messungen der Polymermischung konnte die vollständige Sequenz GKKGG11100 zwar eindeutig identifiziert werden (Abbildung 34), jedoch zeigten besonders die Abbruchsequenzen, die in geringeren Konzentrationen vorhanden waren, Signale mit geringen Signalintensitäten. Besonders im geringen Massenbereich führte dies durch erhöhtes Signalrauschen zu einer erschwerten Identifikation. Die fragmentierungsfreie Sequenzierung ist aufgrund der softwareunterstützten Auswertung jedoch auch bei verrauschten Spektren möglich, sodass die Sequenz eindeutig über die Abbruchsequenzen zugeordnet werden konnte.

Da die MALDI-ToF-MS-Messungen aufgrund des Signalrauschens nur bedingt zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, wurden ESI-FT-ICR-MS-Messungen der Polymermischung durchgeführt. Hierbei war im Vergleich zu den MALDI-ToF-MS-Messungen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich besser und wies besonders im geringen Massenbereich eine große Anzahl an mehrfach-geladenen Spezies auf. Dabei konnten alle Signale dank der spezifischen Isotopenabstände den Mehrfachladungen der erwarteten Sequenzen zugewiesen werden. Interessanterweise nahmen die Signalintensitäten der Sequenzen bei höheren m/z deutlich ab, sodass bei allen Sequenzen die Zweifachladungen höhere Intensitäten als die Einfachladungen zeigten. Besonders deutlich zeigt sich dies an der Sequenz [GKKGG1110], bei der die Zweifachladung eine 97-fach höhere Intensität als die entsprechende Einfachladung aufwies. Da mit steigender Anzahl der Mehrfachladungen jedoch auch die Komplexität der Spektren zunimmt und ein Auswerten der Spektren per Hand keine praktikable Lösung darstellt, wurde ähnlich wie bei den Peptidbibliotheken eine

Spec2Seq-Software programmiert, die automatisch Spektren in deren zugehörige Sequenz übersetzt. Hierbei wurden die intensivsten Signale detektiert und die Signale der Ein-, Zwei- und Dreifachladungen berücksichtigt, was in einer eindeutigen Erkennung der Sequenz resultierte. Durch die hohe Massengenauigkeit des FT-ICR-MS wurden selbst bei einer Massentoleranz von $m/z \leq 0.03$ in der Spec2Seq-Software noch alle Einfachladungen, alle Zweifachladungen und zwei Dreifachladungen detektiert. Durch diese Art der Mehrfachbestimmung ist es möglich, falsche Zuordnungen durch Artefakte oder Verunreinigungen zu vermeiden. Sollte hierbei ein Signal detektiert werden, welches keine passende Mehrfachladung oder kein passendes Isotopenmuster aufweist, kann es von der Sequenzidentifikation ausgeschlossen werden. Generell sind die Signalintensitäten der Abbruchsequenzen deutlich höher als für eine eindeutige Identifikation nötig wäre. Nach

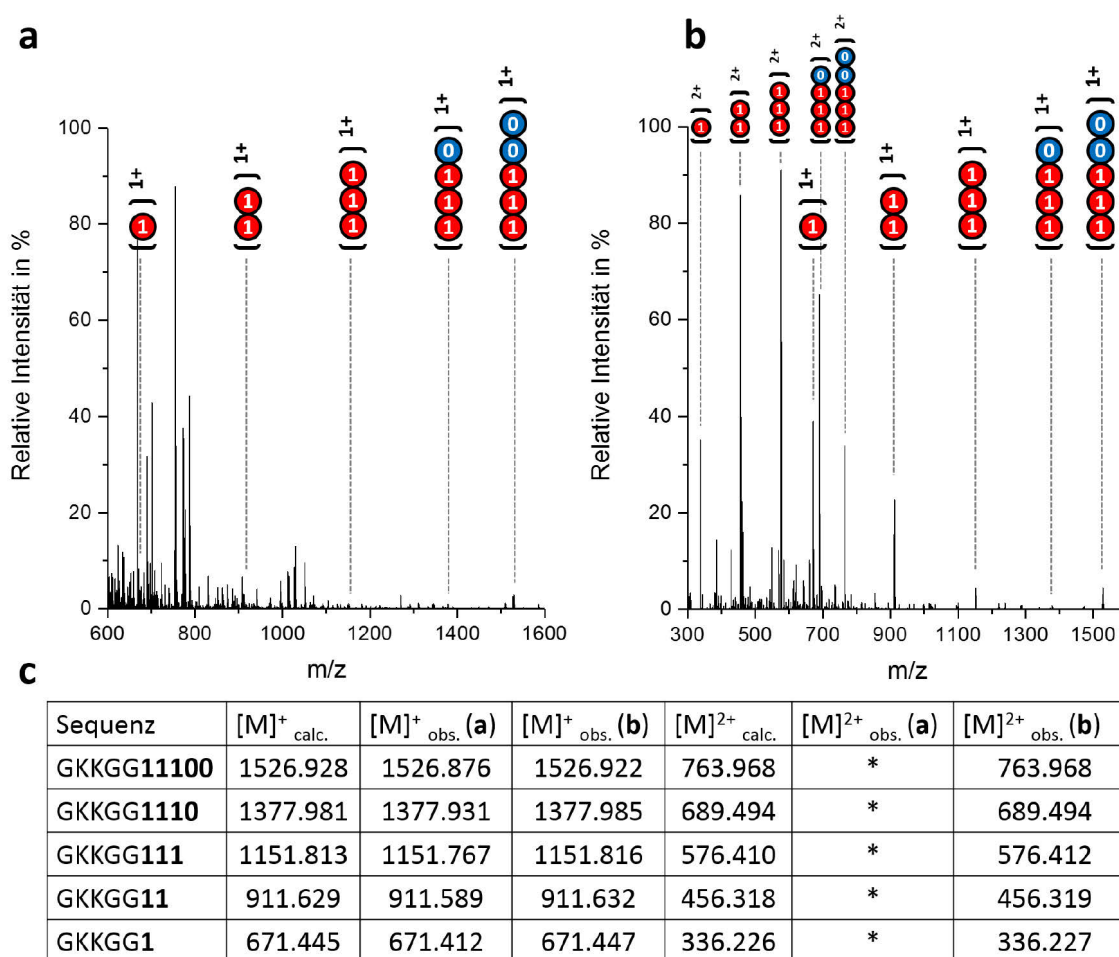


Abbildung 34. Spektren der Polymerspezies PP1 im MALDI-ToF-MS (a) und im ESI-FT-ICR-MS (b). Die Abbruchsequenzen waren im MALDI-MS wegen hohem Signalrauschen schwer detektierbar. Vollständige Identifizierung der Sequenz war sowohl im MALDI-MS, als auch im ESI-MS möglich. (c) Berechnete und beobachtete m/z Verhältnisse für MALDI-MS und ESI-MS-Messungen. * Keine Mehrfachladung detektierbar.

aller Voraussicht ließen sich die initial verwendeten 5 % an *Scavenger* reduzieren, ohne die Sequenzaufklärung negativ zu beeinflussen.

3.5.2 Codierte Oligophosphodiester

Nachdem gezeigt wurde, dass sich Präzisionspolymere mittels Abbruchsequenzenmethodik decodieren lassen, wurde ein zweites *5mer* Präzisionspolymer (**PP2**), zur Klasse der Oligophosphodiester gehörend, hergestellt^v.¹⁷⁵ Die Erzeugung der Abbruchsequenzen wurde im Gegensatz zu der Herstellung des Oligoalkoxyaminamids nicht durch die Zugabe von TEMPO erreicht, sondern durch die Zugabe eines für weitere Reaktionen geblockten Phosphoramidits. Dies sollte zeigen, dass die Erzeugung von Abbruchsequenzen auf verschiedene Art und Weisen erreicht werden kann. Dafür wurden, ähnlich wie bei **PP1**, aufeinanderfolgende, chemoselektive Kupplungsschritte durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Phosphoramidit- und Nitroxidradikal-Kupplung, für die Brom-funktionalisierte Phosphoramidit Monomere und Hydroxy-funktionalisierte Nitroxide genutzt werden. Zur Implementierung eines Codes wurden verschiedene als **0**-Bit und **1**-Bit definierte Phosphoramiditmonomere genutzt, die sich erneut durch die Anzahl an Methylgruppen unterscheiden. Hierbei wurden die Synthone $\text{--O--PO}_2\text{H--O--(CH}_2\text{)}_3\text{--NH--CO--C(CH}_3\text{)}_2\text{--}$ (**0**-Bit, 223.1 Da) und $\text{--O--PO}_2\text{H--O--CH}_2\text{--C(CH}_3\text{)}_2\text{--CH}_2\text{--NH--CO--C(CH}_3\text{)}_2\text{--}$ (**1**-Bit, 251.1 Da) genutzt. In einem zweiten Schritt wurde das Harz analog zu **PP1** mittels Kupferbromid unter Bildung eines kohlenstoffzentrierten Radikal aktiviert, welches mit dem Hydroxy-funktionalisierten Nitroxidradikal reagiert. Als Festphase wurde ein Polystyrol-basiertes TentaGel-NH₂-Harz gewählt, welches mit einem basenlabilen HMBA ((Hydroxymethyl)benzoesäure)-Linker modifiziert wurde. Im Gegensatz zu den Oligoalkoxyaminamiden degradiert das Präzisionspolymer bei TFA-Konzentrationen über 20 – 30 %, weshalb Rink-Amid und Wang-Harze nicht für die Synthese geeignet sind. Diese Eigenschaft wirkt sich auch auf die Spacerwahl aus, da Boc-geschütztes Lysin bei Abspaltung des Polymers von der festen Phase möglicherweise nicht komplett entschützt

^v Die Oligoalkoxyaminamid-Synthese wurden in Kooperation mit GIANNI CAVALLO des Instituts Charles Sadron, Arbeitskreis Dr. habil. J.-F. LUTZ, Precision Macromolecular Chemistry, durchgeführt.

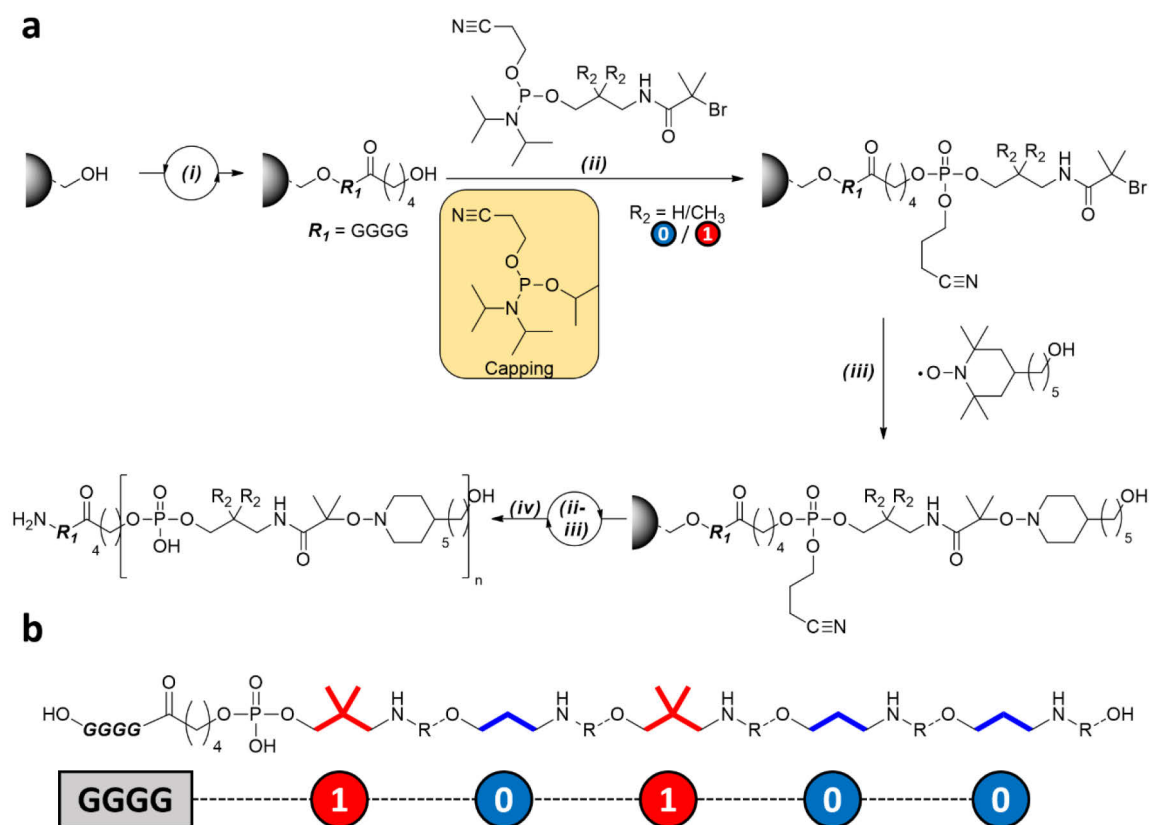


Abbildung 35. (a) Festphasensynthese des sequenzcodierten Oligo(phosphodiester)s GGGG10100 (b). Als Festphase wurde ein TentaGel NH₂-Harz gewählt. Dieses wurde mit einem HMBA Linker, einem peptidischen Spacer und einem Hydroxyl-Linker modifiziert (i). In einem ersten Schritt reagiert ein codiertes Phosphoramidit mit der Hydroxygruppe des Linkers. Abbruchsequenzen werden durch Zugabe von 5 % eines unreaktiven Phosphoramidits erreicht (ii). Anschließend reagiert ein Hydroxy-funktionalisiertes Nitroxid mit einem *in situ* erzeugten Radikal (iii). Schritt (ii-iii) werden bis zur vollständigen Synthese von **PP2** wiederholt. Abspaltung und Entschüttung des Polymers wurde durch Behandlung mit ammoniakalischer Lösung erreicht (iv).

wird. Weiterhin zeigten Vorversuche, dass die Polymermischung in negativen ESI-Messungen bessere Ergebnisse brachte, was einen positiv geladenen Spacer obsolet macht. Es wurden daher vier Glycine an das Harz gekuppelt, um eine gute sterische Erreichbarkeit der funktionellen Gruppen für die Polymersynthese sicherzustellen. Eine weitere auf Hydroxybutansäure basierende Linkereinheit wurde zur Erzeugung einer terminalen Alkoholgruppe eingefügt. Anschließend wurde die vollständige Polymersynthese von **PP2** wie bereits beschrieben durchgeführt (Abbildung 35) und die Polymermischung als weißes Pulver erhalten. Die Probe wurde in Methanol gelöst und mittels MALDI-ToF-MS und ESI-FT-ICR-MS untersucht. Während die MALDI-ToF-MS-Messung keine Ergebnisse lieferte, konnte die Sequenz eindeutig im ESI-FT-ICR-MS im negativen Modus rekonstruiert werden (Abbildung 36). Aufgrund der deutlich höheren Molekulargewichte wurden

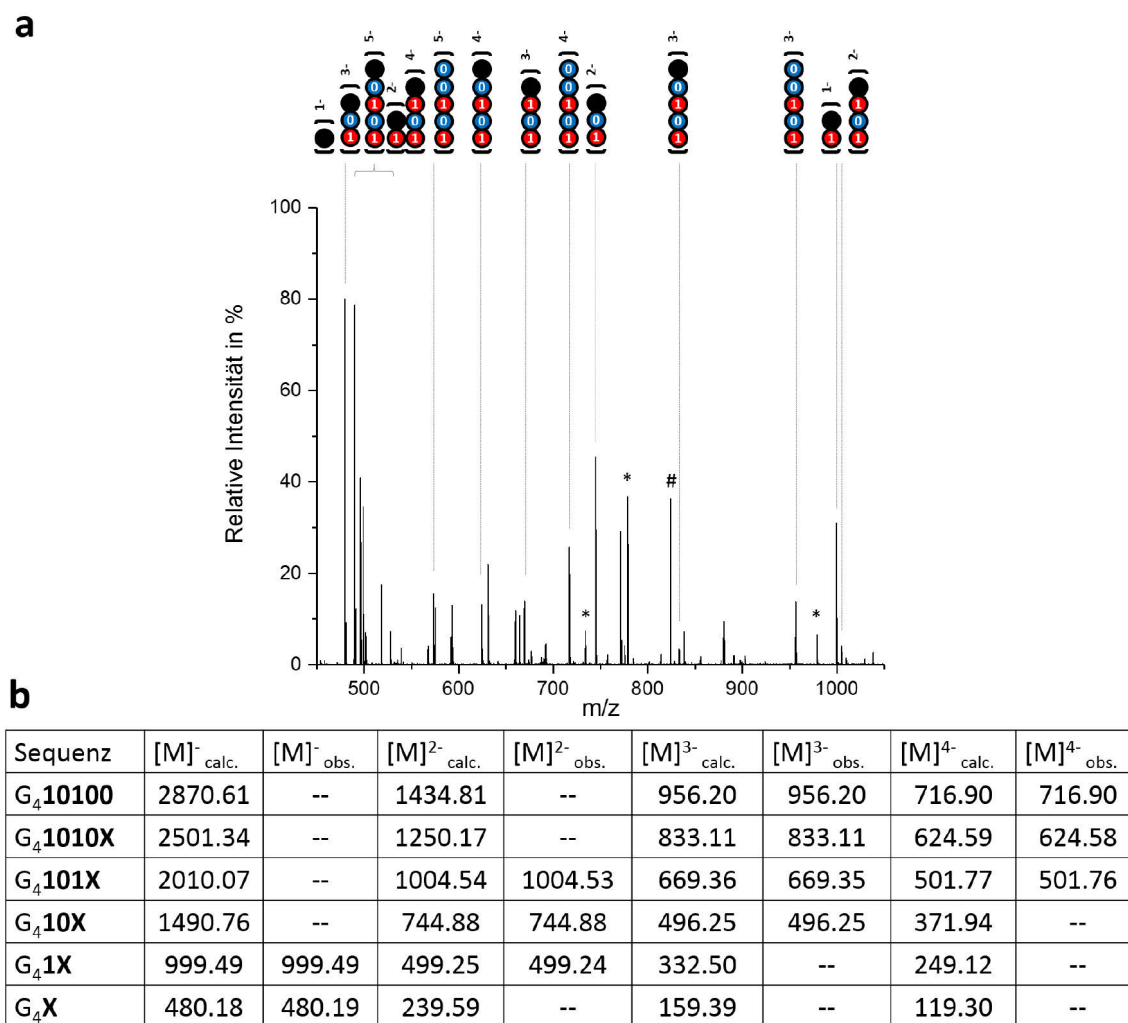


Abbildung 36. Spektren der Polymermischung **PP2** im ESI-FT-ICR-MS (**a**) und die berechneten und beobachteten m/z (**b**). * Hierbei handelt es sich um Natriumaddukte der Abbruchsequenzen; # Artefakt der ESI-FT-ICR-MS-Messung.

dabei vor allem die Mehrfachladungen der Abbruchsequenzen detektiert. Die Massengenauigkeiten waren dabei mit $m/z < 0.01$ hoch, was die Identifizierung weiter vereinfachte. Durch die Phosphatreste wurden zudem Natrium-Addukte beobachtet, die teilweise höhere Intensitäten als die Abbruchsequenzen zeigten und damit das Spektrum komplexer machen. Auch bei **PP2** zeigte sich Potential zu Verringerung der *Scavenger*-Konzentration und zur damit verbundenen Codeverlängerung. Es konnte an **PP1** und **PP2** erfolgreich gezeigt werden, dass die Abbruchsequenzenmethodik für die Analyse von Präzisionspolymeren und somit auch für Polymere geeignet ist, die Seitenkettenfragmentation zeigen. Dabei wurde auf zwei verschiedene *Scavenger*-Systeme zurückgegriffen, die beide erfolgreich umgesetzt werden konnten und damit den Weg für weitere Anwendungen wie z. B. Präzisionspolymerbibliotheken ebnen.

3.6 Modifizierung der Peptid-Polymer Architektur

Nachdem nun durch ein weiteres Abbruchsequenzenscreening (siehe Kapitel 3.4.3) die Auswahl der **Pep₁₋₃-PEG** Konjugate bestätigt wurde, soll im Folgenden der Einfluss der Konjugat-Architekturen auf die Wirkstoffaufnahme und die Wirkstofffreisetzung untersucht und optimiert werden (Abbildung 37, b-d). Konjugat-Modifikationen bieten eine oftmals kostengünstige Plattform zur nachträglichen Feinjustierung der erwähnten Transportereigenschaften. So könnten z. B. durch den Einbau eines hydrophoben Elements die Beladungskapazitäten erhöht, oder auch durch Verkleinerung der PEG-Einheit die Freisetzungskinetiken verbessert werden.

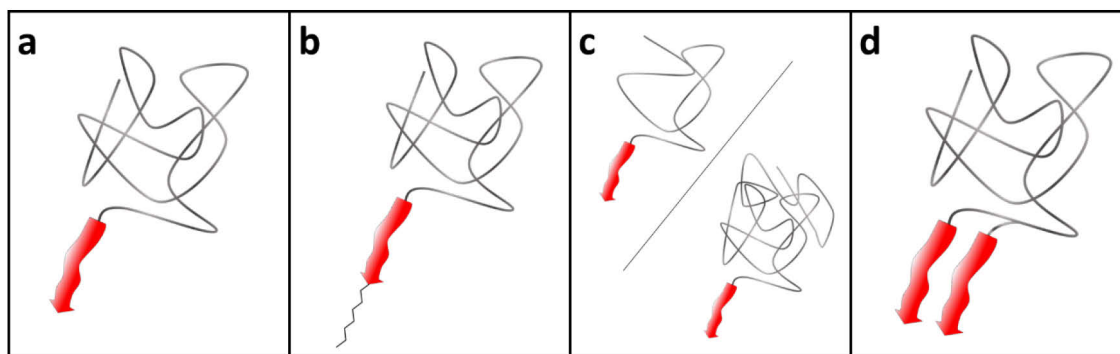


Abbildung 37. Modifikationen der Peptid-Polymer Architektur mit (a) dem Originalkonjugat, (b) dem Einbau eines hydrophoben Segments, (c) der Veränderung der PEG-Größe und (d) der Verzweigung der Bindungsdomäne.

3.6.1 Einbau eines hydrophoben Segments

Da die großtechnische Herstellung von Peptiden wegen des schrittweisen Aufbaus der Peptidsequenzen und deren anschließende Aufreinigung relativ kostenintensiv ist, ist es erstrebenswert, die Beladungskapazitäten der Peptid-Polymer-Konjugate zu erhöhen, um die eingesetzte Menge der Konjugate gering zu halten. Dazu wurde auf eine Strategie zurückgegriffen, die durch den Einbau eines hydrophoben Segments am N-Terminus der Peptidsequenzen unspezifisch zusätzlichen Wirkstoff bindet und in einer Art Reservoir speichert. Als hydrophobes Segment wurde die zu der Klasse der Fettsäuren gehörende Palmitinsäure gewählt, welche eine ausgedehnte aliphatische Kohlenstoffkette besitzt. Der Einbau der Palmitinsäure erfolgte durch manuelle Kupplung nach SPPS an den freien N-Terminus des Peptids. Die daraus resultierenden **Pal-Pep₁₋₃-PEG** wurden anschließend mit BB17 inkubiert und die Beladungskapazität ermittelt. Als Referenz wurde ebenfalls

ein *Pal*-PEG ohne Peptidsequenz inkubiert. Dabei wurde beobachtet, dass alle *Pal*-**Pep**-PEG-Konjugate wie erwartet höhere Beladungskapazitäten als die entsprechenden *Pep*-PEG-Konjugate aufweisen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Beladungskapazitäten der *Pal*-Peptid-Polymer-Konjugate.

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration BB17 ($\mu\text{mol/mL}$)	Verhältnis BB17/Konjugat (mmol/mmol)
<i>Pal</i> - Pep ₁ -PEG	0.94	1:2.2
<i>Pal</i> - Pep ₂ -PEG	1.04	1:2.0
<i>Pal</i> - Pep ₃ -PEG	1.04	1:2.0
<i>Pal</i> -PEG	0.06	1:33

Die stärkste Veränderung der Beladungskapazität zeigte dabei *Pal*-**Pep**₂-PEG mit einer Zunahme von > +300 % gegenüber **Pep**₂-PEG (1:2.0 vs. 1:6.7). Aber auch die beiden anderen Konjugate verdoppelten annähernd die Beladungskapazitäten. Untereinander zeigten die einzelnen *Pal*-*Pep*-PEG-Konjugate kaum Beladungsunterschiede. Dies lässt vermuten, dass die Beladungsgrade nun maßgeblich durch die Palmitinsäurereste bestimmt werden und die Peptidsequenzen nur als Löslichkeitsunterstützer fungieren. Dass die Peptidsequenzen dennoch eine wichtige Rolle übernehmen, zeigt die Kontrolle *Pal*-PEG, welche nur eine geringe Beladungskapazität von 1:33 aufwies. Dafür gibt es möglicherweise verschiedene Erklärungen: Zum einen wäre eine zu starke Bindung des Wirkstoffes an der aliphatischen Kette denkbar, wodurch die Hydrophilie des PEG-Anteils nicht mehr ausreicht um den Wirkstoff zu solubilisieren, zum anderen könnte durch die starken aliphatischen Wechselwirkungen untereinander ein Verdrängen des Wirkstoffes aus den Aggregaten stattfinden. Auch könnte es während der initialen Inkubation des Konjugates in DMSO: Reinstwasser zu unzureichender Durchmischung gekommen sein, welche die anfängliche Dynamik in den Aggregaten herabsetzt und somit für geringe Beladungsgrade sorgt. In Wirkstofffreisetzungstudien mittels Fluoreszenzanisotropie sollten nun die Freisetzungseigenschaften der *Pal*-**Pep**₁₋₃-PEG bestimmen werden (Abbildung 38). Dabei fiel auf, dass die Startwerte der mit Wirkstoff beladenen Konjugate bereits deutlich erhöht waren. *Pal*-**Pep**₂-PEG erreichte den höchsten Startwert mit $A = 0.25$. Dieser Effekt lässt sich auf die Packungsdichte der Fluorophore in den Aggregaten zurückführen. Je dichter die

Anordnung der einzelnen Fluorophore ist, desto stärker tritt der Effekt der Auslöschung der Polarisation auf.¹⁷⁶ Während der Wirkstoff in den Pep-PEG-Konjugaten scheinbar kompakt eingelagert ist, ist er in den *Pal*-Pep-PEG-Konjugaten räumlich weiter voneinander entfernt, womit RET-Effekte reduziert werden. Dies lässt sich möglicherweise über die Palmitinsäurereste begründen, die aufgrund der Hydrophobizität mit dem Wirkstoff interagiert und sich zwischen einzelnen Wirkstoffmolekülen anlagern und direkte Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen unterdrücken. Während sich in *Pal*-**Pep₁**-PEG noch immer signifikante Wirkstoffanreicherungen an der Peptidschicht bilden und damit für eine Anisotropieauslöschung sorgen, wird in *Pal*-**Pep₂**-PEG der Wirkstoff hauptsächlich von Palmitinsäure gebunden, womit es weniger zur Auslöschung kommt. Damit korreliert die Reihenfolge der Startwerte gut mit den anfänglich ermittelten Beladungskapazitäten (**Pep₁**-PEG > **Pep₃**-PEG > **Pep₂**-PEG; 1:3.4, 1:4:0, 1:6.7). Zur Ermittlung der Freisetzungskinetiken wurde die freigesetzte Wirkstoffmenge nach 240 min berechnet. Aufgrund der unterschiedlichen Startwerte wurden die relativen Änderungen der Anisotropiewerte vom jeweiligen Startwert bis zur kompletten Freisetzung bei $A = 0.3$ berechnet. Dabei gaben *Pal*-**Pep₁**-PEG 32 %, *Pal*-**Pep₂**-PEG 75 % und *Pal*-**Pep₃**-PEG 77 % Wirkstoff frei. Auch wenn *Pal*-**Pep₂**-PEG und *Pal*-**Pep₃**-PEG scheinbar unterschiedliche Profile zeigen, so ist deren relative Änderung bei Berücksichtigung der jeweiligen Startwerte über

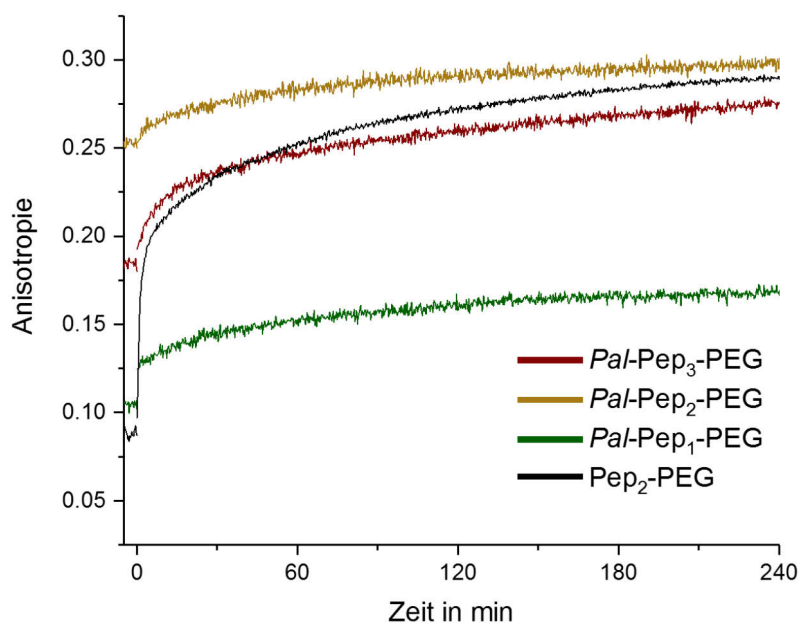


Abbildung 38. Fluoreszenzanisotropiemessungen der *Pal*-Pep₁₋₃-PEG und der Referenz **Pep₂**-PEG (schwarz) nach Zugabe von BSA $t = 0$ min.

die Zeit vergleichbar. Die *Pal-Pep-PEG* Konjugate gaben deutlich weniger Wirkstoff frei als die entsprechenden *Pep-PEG*-Konjugate. Damit wurde bestätigt, dass die Freisetzungskinetiken maßgeblich von der Peptidsequenz gesteuert werden. Das unvollständige Freisetzungsprofil (besonders deutlich bei *Pal-Pep₁-PEG*) lässt sich über die Ausbildung eines hydrophoben Kerns in den Aggregaten erklären, welcher zu einer starken Bindung des Wirkstoffes führt, der somit nicht freigegeben werden kann.⁸⁸

3.6.2 Veränderung der PEG-Größen

Auch die PEG-Längen können einen signifikanten Einfluss auf die Beladungskapazitäten und die Wirkstofffreisetzungen haben. Gerade bei der Freisetzung sollten größere PEG-Ketten den Wirkstoff effizienter gegen äußere Einflüsse abschirmen, kleinere PEG-Ketten zu einer schlechteren Abschirmung führen. Da der Einsatz von PEG im Gegensatz zur Peptidsynthese relativ kostengünstig ist, bietet es sich an, die Freisetzungseigenschaften der Konjugate über deren PEG-Hülle zu steuern. **Pep₃** wurde dabei als Testpeptid gewählt. Um eine möglichst große Variation an PEG-Längen zu bieten, wurden vorbeladenen Synthescharze mit PEG-Längen von $M_n = 850$ g/mol und $M_n = 5000$ g/mol gewählt. Überraschenderweise zeigte **Pep₃-PEG₈₅₀** keine signifikante Beladungskapazität, weshalb anzunehmen ist, dass die Hydrophilie des PEG₈₅₀ nicht ausreicht, um den an das Peptid gebundenen hydrophoben Wirkstoff zu stabilisieren. **Pep₃-PEG₅₀₀₀** hingegen zeigte eine Beladungskapazität von 1:2.4 (mmol Wirkstoff/mmol Konjugat), womit sich die molare Beladungskapazität im Vergleich zu **Pep₃-PEG₃₀₀₀** um ca. 70 % erhöhte. Wirkstofffreisetzungsexperimente zeigten wie erwartet eine deutlich verlangsamte Wirkstofffreisetzung mit einem t_{80} -Wert von 65 min (gegenüber 10 min für **Pep₃-PEG₃₀₀₀**) (Abbildung 39). Somit bestätigte sich die Vermutung, dass die Verwendung einer größeren PEG-Einheit zu einer besseren Abschirmung und damit zu verlangsamten Freisetzungskinetiken führt. Die Freisetzungseigenschaften des **Pep₃-PEG₅₀₀₀** sind interessanterweise dem **Pep₂-PEG₃₀₀₀** sehr ähnlich, jedoch mit einem deutlich höheren Beladungsgrad ($t_{80} = 65$ min vs. $t_{80} = 65$ min und Beladungskapazitäten von 1:2.4 vs. 1:6.7).

3.6.3 Verzweigung der Bindungsdomäne

Eine dritte Möglichkeit der Beladungserhöhung ist die Verwendung verzweigter Bindungsdomänen (Abbildung 37, c). Dazu wurde vor Synthese der Peptidsequenz ein Fmoc-Lys(Fmoc)-OH an das Harz gekuppelt. Somit können an einer einzelnen PEG-Einheit zwei Peptidsequenzen parallel synthetisiert werden, sowohl am *N*-Terminus, als auch an der Seitenkette. Das verzweigte (**Pep**₃)₂-PEG zeigte mit einer Beladungskapazität von 1:4.2 ähnliche Beladungskapazitäten wie **Pep**₃-PEG. Dies überrascht, da aufgrund der verzweigten Bindungsdomäne doppelt so viele Peptidsequenzen für die Wirkstoffbindung zur Verfügung stehen. Möglicherweise verhindert die hohe Dichte an Sequenzen im Aggregat eine effiziente Wirkstoffaufnahme. Die Wirkstofffreisetzung war mit $t_{80} = 45$ min deutlich langsamer als **Pep**₃-PEG ($t_{80} = 10$ min) (Abbildung 39). Dies deutet auf eine stärkere Bindung des Wirkstoffes hin, die sich ebenfalls durch einen erhöhten Startwert der Anisotropie äußerte. Hierbei können direkt benachbarte Peptide Wirkstoff multivalent binden. Interessanterweise zeigte das Freisetzungsprofil eine anfänglich schnelle *Burst*-Freisetzung, die sich einer vollständigen Freisetzung annähert. Dabei werden wahrscheinlich monovalent gebundene Wirkstoffe an der Peripherie der Aggregate leicht an BSA transferiert, jedoch die multivalent gebundenen Wirkstoffe effektiv zurückgehalten. Dieses Profil ist für

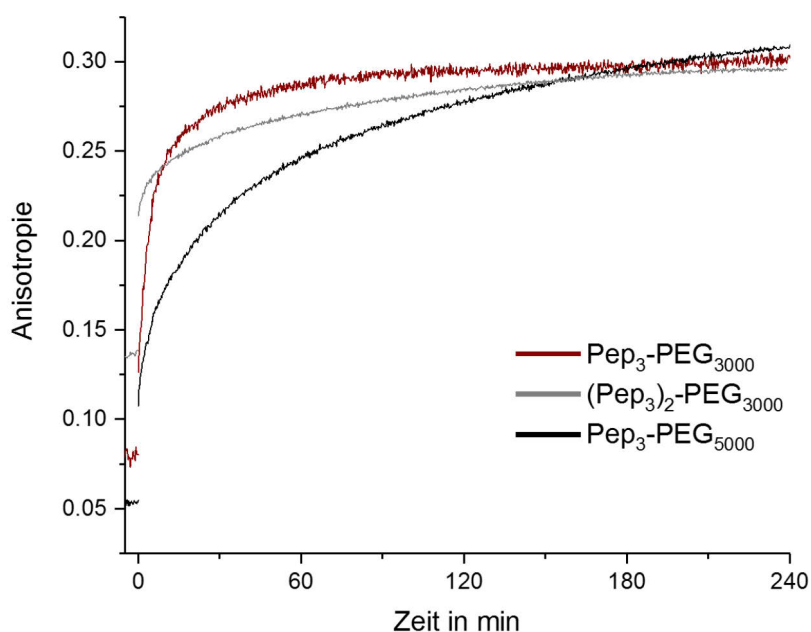


Abbildung 39. Anisotropiemessungen der Konjugate mit verlängerter PEG-Größe und mit verzweigter Bindungsdomäne nach Zugabe von BSA zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Als Referenz wurde ebenfalls **Pep**₃-PEG₃₀₀₀ abgebildet (rot).

Anwendungen geeignet, bei denen initial hohe Wirkstoffkonzentration im Körper erreicht und über längere Zeit konstant gehalten werden sollen.

Während die vorgestellten Modifikationen nur auf leichten Variationen der Bindedomäne und der Polymerlänge basieren, soll nun im Folgenden das Polymer zur Löslichkeitsvermittlung gewechselt werden und der Einfluss auf die Freisetzungskinetiken untersucht werden.

3.7 Peptid-Polysarkosin-Konjugate als Wirkstofftransporter

In biomedizinischen Anwendungen wird Polyethylenglycol wegen der guten Wasserlöslichkeit, geringen Toxizität, geringen Proteinwechselwirkung und der breiten kommerziellen Verfügbarkeit traditionell gerne verwendet.¹⁷⁷⁻¹⁷⁸ Dennoch zeigen PEGylierte Substanzen bei genauerer Betrachtung eine gewissen Immunogenizität und Antigenizität.¹⁷⁹ So wurden bereits Antikörper gegen PEG in Patienten entdeckt, die zu einer erhöhten Entfernung PEGylierter Konjugate aus dem Körper führten.¹⁷⁹⁻¹⁸² Dieses ABC-Phänomen („accelerated blood clearance“) beeinflusst stark den Erfolg einer Behandlung mit PEGylierten Systemen.¹⁸³ Es wurden eine Reihe von Alternativsystemen wie z. B. Polypeptide, Polypeptide oder auch Poly(2-oxazoline) entwickelt,¹⁷⁷ die als potentieller PEG-Ersatz genutzt werden können. Das Polypeptoid Polysarkosin stellt eine verhältnis-

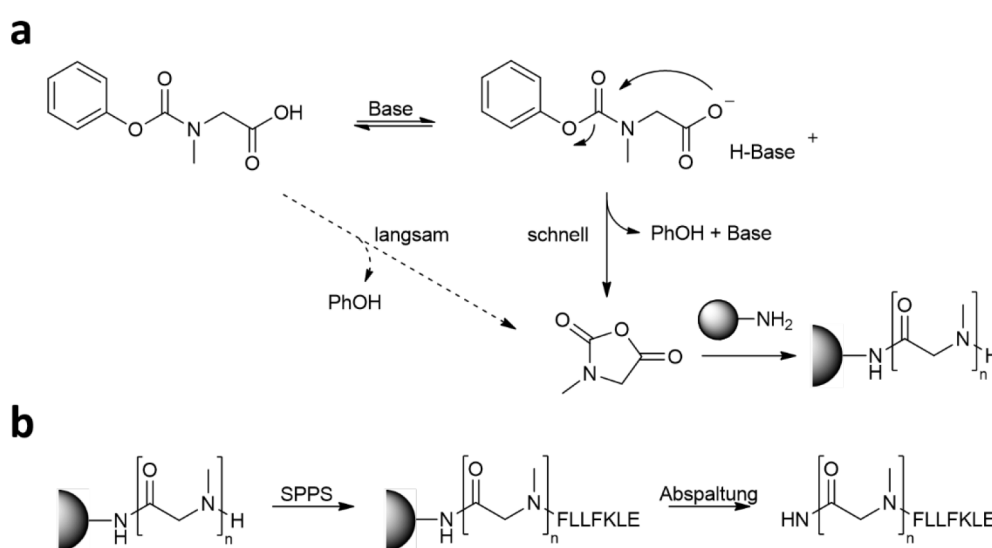


Abbildung 40. Generelle Synthese eines mit Polysarkosin beladenen Harzes über die NCA-freie Strategie (a) und die anschließende Synthese einer Peptidsequenz an das Syntheseharz (b).

mäßig neue, aber vielversprechende Plattform dar.⁷⁵ Es soll daher ein Peptid-Polysarkosin-Konjugat synthetisiert und mit den PEG-Systemen verglichen werden. Polysarkosin wird normalerweise durch die Polymerisation von *N*-Carboxyanhydriden (NCAs) hergestellt, welche zum einen recht feuchtigkeitsempfindlich sind und zum anderen über giftige Phosgenderivate hergestellt werden müssen.¹⁸⁴ Es wurde daher auf eine „grünere“ Methode zurückgegriffen, die NCAs *in situ* erzeugt und damit feuchtigkeitsunempfindlich und ungiftig ist.¹⁸⁵ Diese für lösemittelbasierte Systeme entwickelte Strategie wurde auf ein Festphasensyntheseharz übertragen.^{vi} Dabei wird ein mit Polysarkosin beladenes Harz hergestellt, welches anschließend analog dem mit PEG vorbeladenem PAP-Harz als Festphase für die Peptidsynthese genutzt werden kann (Abbildung 40). Die Reaktion wurde im Überschuss an *N*-Phenoxycarbonyl-Sarkosin (Poc-Sar, [Poc-Sar]_{t=0} = 0.77 M) mit 0.02 Äq. Rink-Amid-Harz und 0.16 Äq. DIPEA für 24 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde eine Fraktion des Polysarkosins mit TFA von der Festphase abgespalten und im MALDI-ToF-MS vermessen (Abbildung 41). Dabei wurde Polysarkosin eindeutig nachgewiesen und die Masse $M_p = 2410$ g/mol und die massenmittlere molare Masse $M_w = 2606$ g/mol ermittelt. Es wurde ein Polydispersitätsindex von

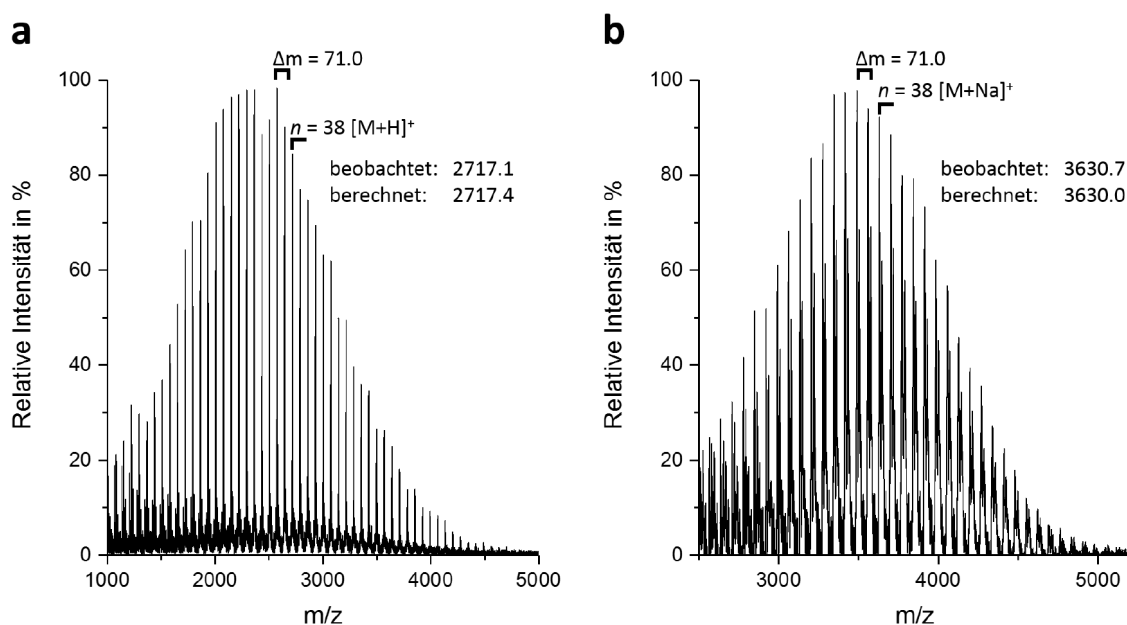


Abbildung 41. MALDI-ToF-MS-Messungen des vom Harz abgespaltenen Polysarkosins (a) und nach Kuppelung des Peptids ELKFLF (b) im linearen Messmodus.

^{vi} Die Synthese der mit Polysarkosin beladenen Festphase wurde in Kooperation mit AFRODITI DORITI vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung hergestellt.

$D_{app, MALDI} = 1.08$ ermittelt, der jedoch aufgrund der engen Verteilungsbreiten im MALDI nur bedingt aussagekräftig ist. Dennoch wurden geringe Polydispersitäten ebenfalls für dispergierte Systeme beschrieben, womit die Herstellung des festphasenbasierten Polysarkosins eine gleichwertige Alternative zur bereits literaturbeschriebenen Synthese darstellt. Anschließend wurde eine manuelle Peptidsynthese mit PyBOP als Kupplungsreagenz durchgeführt. Als Bindesequenz für BB17 wurde dabei auf die bewährte Peptidsequenz **Pep₃** (ELKFLLF) zurückgegriffen. Aufgrund des terminalen sekundären Amins der Polysarkosin-modifizierten Festphase wurde die erste Aminosäure (Phe) dreifach gekuppelt und anschließend acetyliert. MALDI-ToF-MS-Messungen des abgespaltenen und entsalzten Peptid-Polymer-Konjugats **Pep₃-PSar** bestätigte dabei die erfolgreiche Synthese. Dabei wurde die Masse $M_p = 3480$ g/mol bestimmt. Wie zu erwarten, zeigte **Pep₃-PSar** ebenfalls eine geringe Polydispersität, die vergleichbar mit PEG-basierten Systemen ist ($D_{(PEG)} = 1.04$). In NMR-Messungen wurde ein etwas erhöhter $M_n = 3960$ g/mol bestimmt, der durch einen direkten Vergleich der aromatischen Signale der Phenylalanine mit den CH_2 des Polysarkosins ermittelt wurde und damit zuverlässiger als die Bestimmung über MALDI-MS ist.

Zur Überprüfung der Eignung als Wirkstofftransporter wurde eine Inkubation des Konjugats vorgenommen, bei der eine Beladungskapazität von 1:1.2 (mmol BB17/mmol Konjugat) gemessen wurde. Dies stellt im direkten Vergleich zu **Pep₃-PEG** eine 3-fache Verbesserung dar. Da beide Systeme auf der gleichen Peptidsequenz basieren, liegt nahe, dass die Erhöhung der Beladungskapazität auf eine Wechselwirkung von BB17 mit Polysarkosin zurückzuführen ist. Dies lässt sich möglicherweise durch die Alkylierung der Glycine im Polysarkosinrückgrat erklären, die scheinbar in der Lage sind ebenfalls geringe Mengen an Wirkstoff zu binden. Interessanterweise zeigte mit BB17 beladenes **Pep₃-PSar** in Wirkstofffreisetzungstests ähnlich Freisetzungseigenschaften wie **Pep₃-PEG** (Abbildung 42.). Damit ist ein Wirkstofftransport mit **Pep₃-PSar** deutlich effektiver als mit **Pep₃-PEG**, da für gleiche Freisetzungseigenschaften nur ein Drittel der Konjugatmenge benötigt wird. Weiterhin implizieren die Ergebnisse, dass Polysarkosin geringe Abschirmeffekte für den Wirkstoff bietet und daher für Anwendungen mit schneller Freisetzung relevant sind.

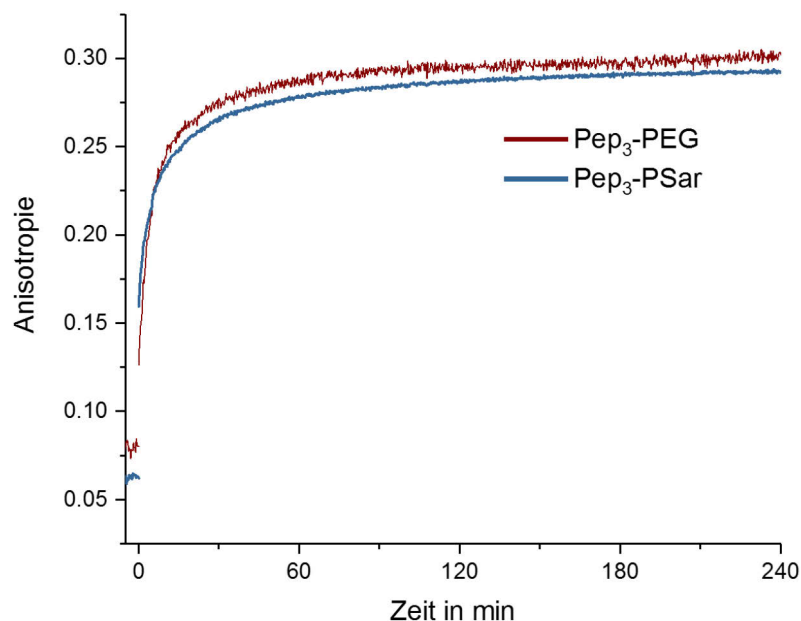


Abbildung 42. Anisotropiemessungen von **Pep₃-PSar** nach Zugabe von BSA zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Als Referenz wurde ebenfalls **Pep₃-PEG₃₀₀₀** abgebildet (rot).

3.8 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung in Zelltests

Nachdem sowohl **Pep₁₋₃-PEG**, als auch deren Modifikationen vielversprechende Ergebnisse in Beladungs- und Freisetzungsexperimenten zeigten, sollen im Folgenden die Aktivitäten bezüglich der Inhibierung von den für die ALZHEIMER-Krankheit verantwortlichen Tau-Protein-Agglomeraten näher untersucht werden. Damit wäre eine direkte Beurteilung der Transportsysteme in biologischen Experimenten und die Bestimmung der Potentiale für einen Einsatz im Körper möglich. Als Hauptschwierigkeiten gelten hierbei die Überwindung der Zellmembran und das erfolgreiche Einschleusen des Wirkstoffes in die Zellen.

In vitro Studien der Konjugat-Wirkstoff-Komplexe geben in einem Schnelltest bereits wertvolle Informationen zur Einschätzung der Wirkstoffaktivitäten. In diesem Test werden Tau^{3RD}-Proteine (K19, drei Wiederholungseinheiten) mit Heparin und verschiedenen Konzentrationen an Konjugat-Wirkstoff-Komplexen inkubiert und die Filamentkonzentration anschließend über ein ThS Assay (Thioflavin S) bestimmt. K19 neigt zur Polymerisation in Gegenwart von Polyanionen, wobei Heparin sich gegenüber anderen Polyanionen wie z. B. Ribonukleinsäure (RNA) oder Polyglutamat als besonders effektiv in der Filamentbildung zeigte.¹⁸⁶ ThS fungiert als Reportermolekül, welches seine Fluoreszenzemission

beim Binden an Filamentstrukturen ca. 35-fach erhöht und damit Tauaggregation quantitativ anzeigt. Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten lassen sich anschließend die IC₅₀-Werte, also die mittleren inhibitorischen Konzentrationen der Konjugat-Wirkstoff-Komplexe auf die Filamentbildung, ermitteln. Im günstigsten Fall sollten die IC₅₀-Werte dabei im unteren μM Bereich liegen.¹⁸⁷

Für die Zelltests wurde eine schnell wachsende, auf Mauszellen basierende N2a (Neuro-2a, Neuroblastoma-2a)-Zelllinie genutzt. Diese differenzierten Zellen weisen viele Eigenschaften von Neuronen auf, z. B. Mikrotubuli und Neurofilamente, und eignen sich daher als Testsystem zur Untersuchung der Tauaggregation. Die verwendete N2a-Zelllinie basiert auf dem Mikrotubulus-bindenden 4-repeat-Tau-Konstrukt (K18, 4-Wiederholungseinheiten) mit einer Deletions-Mutation ΔK280 (Tau^{4RD} ΔK280 oder auch Tau^{4RD Δ K}). Diese Zelllinie weist eine beschleunigte Aggregation von Tau in pathologische Filamente auf, die bereits nach wenigen Tagen nach Anschalten der Gen-Expression sichtbar ist.¹⁸⁸⁻¹⁹¹ Das Anschalten der Expression wurde dabei über ein Tet-On System erreicht (Tetracyclin-kontrollierte transkriptionelle Aktivierung), welches über die Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin gesteuert wird. Die Zellen wurden 4 Tage mit den Konjugat-Wirkstoff-Komplexen inkubiert und die Tau-Fractionen anschließend untersucht.

3.8.1 Aktivitäten der Konjugat-Wirkstoff-Komplexe

Pep₁₋₃-PEG/BB17-Komplexe zeigten in *in vitro* Untersuchungen geringe IC₅₀-Werte im Bereich von 3.3 - 9.6 μM (Tabelle 5, Abbildung 43). Dabei erzielte **Pep₂-PEG/BB17** überraschenderweise den geringsten IC₅₀-Wert, der jedoch ca. 10-fach höher ist als reines BB17 in DMSO.⁴ Dabei sollte jedoch betrachtet werden, dass der Wirkstoff sich in lösungsmittelfreien Experimenten in einem kompetitiven Gleichgewicht zwischen Konjugat und Tauprotein befindet. In lösungsmittelbasierten Experimenten fehlt das Konjugat, womit der gesamte Wirkstoff mit dem Tauprotein interagieren kann und damit deutlich geringere IC₅₀-Werte erreicht.

Insgesamt bewegen sich die IC₅₀-Werte im Bereich von < 10 μM , was die Systeme für reale Anwendungen interessant macht. Um einen Einfluss der Peptid-Polymer-Konjugate auf die Tauaggregation auszuschließen, wurden Messungen der unbeladenen **Pep₁-PEG** und

Pep₃-PEG-Konjugate durchgeführt. Diese zeigten auch bei hohen Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) keine Veränderung in der Filamentbildung. Ebenfalls wurden die beladenen **Pep₁-Spacer-PEG/BB17** und **Pep₃-Spacer-PEG/BB17** vermessen. Die erreichten IC₅₀-Werte waren deutlich geringer als die der entsprechenden Pep-PEG-Konjugate. Die Gründe können hierfür vielseitig sein: Möglicherweise werden die ionischen Wechselwirkungen der Spacereinheiten durch die Zugabe des Polyanions Heparin unterdrückt oder PEG kann den Wirkstoff nicht gegen das kleine, hydrophile K19 abschirmen.

Tabelle 5. IC₅₀-Werte und gesamte Tau-Reduktion der mit Wirkstoff beladenen **Pep₁₋₃-PEG** und **Pep₁₋₃-Spacer-PEG**-Konjugate (n.d. = nicht bestimmt). Die relative Tau-Menge wurde durch einen Vergleich mit einer unbehandelten Probe berechnet.

Konjugat-Wirkstoff-Komplex	IC ₅₀ -Wert (μM)	Relative Tau-Menge
Pep₁-PEG/ Pep₁-Spacer-PEG	9.6/ 1.3	-5 %/ -10 %
Pep₂-PEG/ Pep₂-Spacer-PEG	3.3/ n.d.	-17 %/ n.d.
Pep₃-PEG/ Pep₃-Spacer-PEG	4.8/ 1.4	-55 %/ -18 %

In den Zelltests reduzierte **Pep₁-PEG/BB17** die gesamte Tau^{4RDAK}-Menge nur um 5 %, wobei die unlösliche/lösliche Fraktion, verglichen mit der Referenz, auf gleichem Level gehalten wurde. **Pep₂-PEG/BB17** konnte die gesamte Tau^{4RDAK}-Menge bereits um 17 % senken, wobei auch hier die unlösliche/lösliche Fraktion konstant blieb. Der stärkste Effekt war bei **Pep₃-PEG/BB17** sichtbar, welches nicht nur die Gesamtmenge an Tau^{4RDAK} um 55 % senkte, sondern auch die relative Menge an unlöslicher Fraktion reduzierte. In der Literatur wird beschrieben, dass diese Verlagerung von unlöslichem zu löslichem Tau einen positiven Effekt auf die Zellebensdauer hat, z. B. durch proteasomalen Peptidabbau der Aggregate oder Exozytose.⁴

Es wurde ein klarer Trend der Konjugat-Wirkstoffe-Komplexe (**Pep₃-PEG** > **Pep₂-PEG** > **Pep₁-PEG**) festgestellt, jedoch gilt es zu erwähnen, dass Korrelationen von Freisetzungseigenschaften und Ergebnissen aus Zelltests nicht direkt möglich sind. Viel mehr hängen

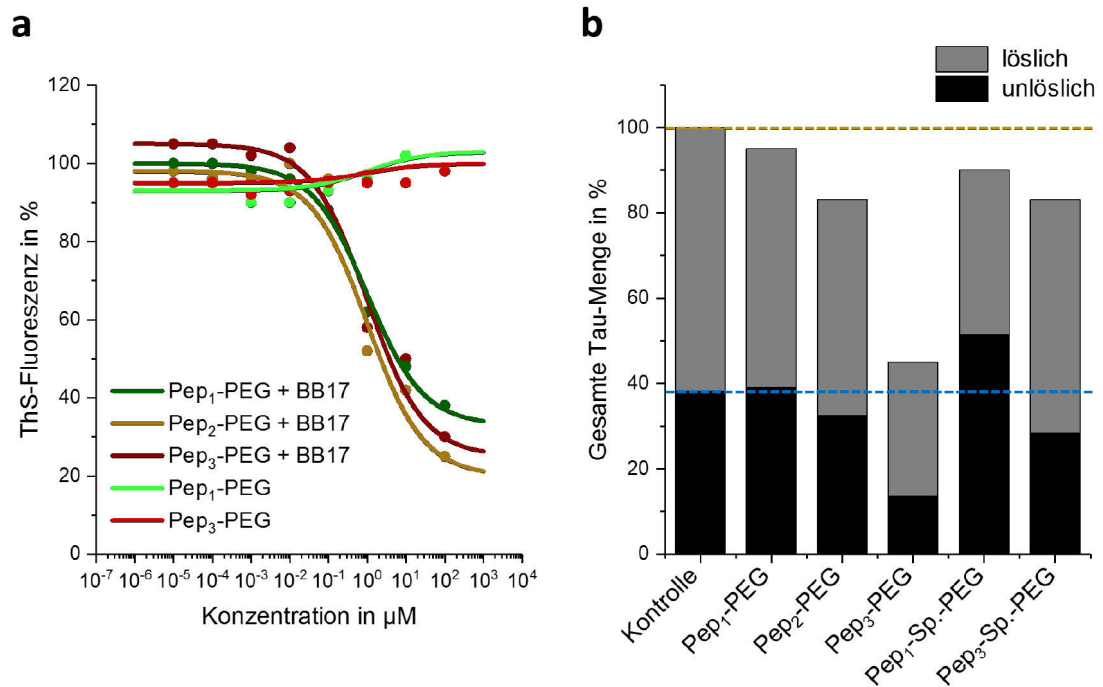


Abbildung 43. *In vitro* Bestimmung der IC₅₀-Werte von beladenen **Pep₁₋₃-PEG** und negativ-Kontrolle von **Pep₁-PEG** und **Pep₃-PEG** (a). Ergebnisse der Zelltests von **Pep₁₋₃-PEG** und **Pep₁-Spacer-PEG** und **Pep₃-Spacer-PEG**, als positiv-Kontrolle wurde ein reines + Dox Inkubat erstellt (b).

die Ergebnisse der Zelltests von physikochemischen Eigenschaften wie z. B. der bereits erwähnten Zellaufnahme oder Verteilung des Wirkstoffes in der Zelle ab. **Pep₁-Spacer-PEG/BB17** und **Pep₃-Spacer-PEG/BB17** zeigten geringe Effekte mit Tau^{4RDAK} Reduktionen von 10 - 18 %. Zwar reduzierte auch hier **Pep₃-Spacer-PEG/BB17** den relativen Anteil der unlöslichen Fraktion, dennoch stellt es keine Verbesserung zu den 7mer Systemen dar. Auch dies passt zu dem Trend der Wirkstofffreisetzungseigenschaften, bei denen gezeigt wurde, dass der Wirkstoff in den Pep-Spacer-PEG besser abgeschirmt vorliegt.

3.8.2 Aktivitäten modifizierter Konjugat-Wirkstoff-Komplexe

Die beladenen *Pal*-Pep-PEG Derivate zeigten in den *in vitro* Experimenten diverse Eigenschaften. Während sich *Pal*-**Pep₃-PEG/BB17** wie die entsprechenden Pep-PEG-Konjugate verhielt und einen IC₅₀-Wert von 6.0 μM zeigte, wurden bei *Pal*-**Pep₁-PEG/BB17** und *Pal*-**Pep₂-PEG/BB17** anfänglich noch Reduktionen der Filamentbildung beobachtet, die bei *Pal*-**Pep₁-PEG/BB17** mit steigender Konjugat-Wirkstoff-Komplex-Konzentration sogar wieder anstiegen (Abbildung 44). Somit konnten keine IC₅₀-Werte bestimmt werden, da die entsprechenden IC₅₀-Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt erreicht werden

konnten (Tabelle 6). Eine unbeladene Kontrolle von *Pal-Pep₃-PEG* zeigte bei einer Konzentration von 10 μM einen starken Anstieg (+100 %) der Filamentbildung, was darauf hindeutet, dass der Palmitinsäurerest aufgrund der erhöhten Hydrophobizität die Filamentbildung induziert. Dieser Effekt der verstärkten Filamentbildung ist in der Literatur für reine Fettsäuren (u.a. auch Palmitinsäure) beschrieben und ist bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ sichtbar. Der genaue Mechanismus ist hierbei ungeklärt, jedoch wird vermutet, dass es zu einer Stabilisierung der hydrophoben Domänen der Taufilemente kommt und damit das Gleichgewicht auf die Seite der aggregierten Spezies gedrückt wird.¹⁹²

Bei den beladenen Konjugat-Wirkstoff-Komplexen werden daher zwei Mechanismen beobachtet: Die Inhibierung der Filamentbildung durch BB17 und die Induktion der Filamentbildung durch Palmitinsäurederivate. Die Wirkstofffreisetzungsratescheint nur bei *Pal-Pep₃-PEG/BB17* ausreichend zu sein, um den Effekt der Palmitinsäurederivate zu kompensieren. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch hier bei höheren Konjugatkonzentrationen die Induktionseffekte überwiegen.

Tabelle 6. IC₅₀-Werte und gesamte Tau-Reduktion der mit Wirkstoff beladenen modifizierten Konjugate (-- = kein IC₅₀-Wert ermittelbar). Die relative Tau-Menge wurde durch einen Vergleich mit einer unbehandelten Probe berechnet.

Konjugat-Wirkstoff-Komplex	IC ₅₀ -Wert (μM)	Relative Tau-Menge
<i>Pal-Pep₁-PEG</i>	--	+40 %
<i>Pal-Pep₂-PEG</i>	--	+70 %
<i>Pal-Pep₃-PEG</i>	6.0	+30 %
Pep₃-PEG₅₀₀₀	1.5	-60 %
(Pep₃)₂-PEG	--	-50 %
Pep₃-PSar	1.4	+70 %

Auch in den Zelltests zeigten die mit Wirkstoff beladenen *Pal*-PEG-Konjugate einen starken Anstieg der gesamten Taukonzentration, womit das Gegenteil des erwünschten Effekts erreicht wurde. Dabei scheint der Grund für die übermäßige Tauexpression in der Anwesenheit der Palmitinsäure-Derivate zu liegen, da diese Effekte bei den anderen Konjugaten nicht beobachtet wurden. In der Literatur wurde bereits die schnelle Aufnahme von Palmitinsäure-Amiden in Neuro-2a Zelllinien beschrieben, weshalb anzunehmen ist,

dass auch die *Pal*-PEG-Konjugate mit ausgeprägtem amphiphilischen Charakter von den Zellen aufgenommen werden.¹⁹³ Neuroblastomazellen weisen im Vergleich zu anderen Zelltypen wie z. B. Myozyten eine sehr hohe FAAH-Aktivität (Fettsäureamid-Hydrolase) auf.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Diese hydrolysieren verschiedene Fettsäureamide im intrazellulären Raum und versorgen die Mitochondrien mit den erhaltenen Fettsäuren, welche über die β -Oxidation zerlegt werden und damit Acetyl-CoA in den Citratzyklus einschleusen. In der Literatur ist dieser Effekt für verschiedenen Zelllinien beschrieben, in denen eine Bandbreite von gesättigten und ungesättigten Fettsäurederivaten effektiv gespalten wurden, unter anderem auch Derivate der Palmitinsäure.¹⁹⁷ Die aus dem Abbau der *Pal*-Derivate gewonnene Energie kann möglicherweise anschließend von den Zellen genutzt werden, um erhöhte Mengen an Tau^{4RDAK} zu transkribieren. Somit stellen die *Pal*-Pep-PEG-Konjugate zwar eine Verbesserung des Wirkstofftransportsystems dar, jedoch können sie in den hier präsentierten Zelltests keine verbesserte Tau-Inhibierung zeigen. Trotzdem zeigt dieses System hohes Potential für weitere, nicht auf Neuroblastomazellen basierende Systeme.

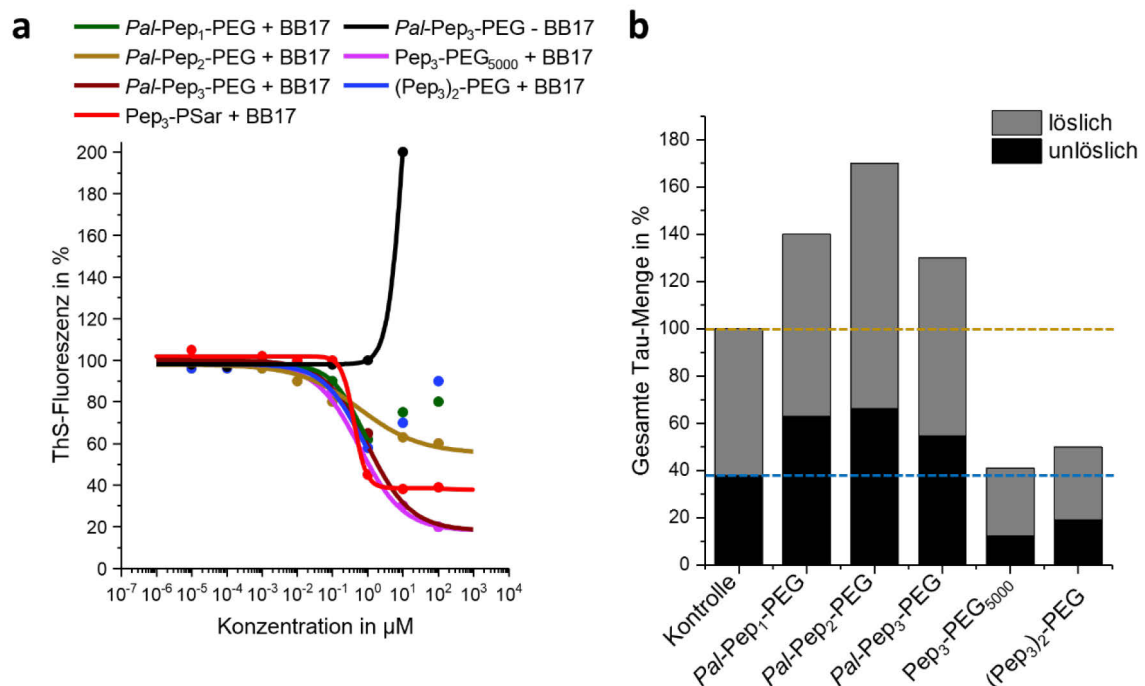


Abbildung 44. *In vitro* Bestimmung der IC₅₀-Werte von beladenen Konjugat-Modifikationen und der negativ-Kontrolle *Pal*-Pep₃-PEG (a). Ergebnisse der Zelltests, wobei Pep₃-PSar aufgrund der Verwendung einer anderen Kontrolle nicht gezeigt wird. Als positiv-Kontrolle wurde ein reines + Dox Inkubat erstellt (b).

Pep₃-PEG₅₀₀₀/BB17 zeigte einen IC₅₀-Wert von 1.5 µM und liegt damit in der Größenordnung von **Pep₃-Spacer-PEG/BB17**. Für **(Pep₃)₂-PEG/BB17** konnte überraschenderweise kein IC₅₀-Wert bestimmt werden. Auch hier könnte die erhöhte Hydrophobizität der Konjugate eine Filamentbildung induzieren. Die Zelltests zeigten für beide Systeme eine Reduktion der gesamten Tau-Konzentration an. Dabei erreichte **Pep₃-PEG₅₀₀₀/BB17** eine Reduktion um 60 % und übertrifft damit **Pep₃-PEG/BB17** (55 %), während bei **(Pep₃)₂-PEG/BB17** eine Reduktion von 50 % beobachtet wurde. Ebenfalls wurden die relativen unlöslichen Anteile effektiv reduziert. Die beiden Konjugatmodifikationen scheinen jedoch in Zelltests keinen großen zusätzlichen Einfluss auf die Taukonzentrationen und Tauaggregationen zu haben, sondern werden primär von der Peptidsequenz dominiert.

Für **Pep₃-PSar** wurde ein IC₅₀-Wert von 1.4 µM ermittelt, welcher 3-fach geringer als **Pep₃-PEG** ist. Dies zeigt das hohe Potential von Polysarkosinkonjugaten als Löslichkeitsvermittler in medizinischen Anwendungen. **Pep₃-PSar/BB17** zeigte in den Zelltests jedoch einen Anstieg der gesamten Taukonzentration (+70 %), was auf *off-target* Aktivitäten schließen lässt (Abbildung 44). Gleichzeitig wurde aber – wie bei den anderen Konjugaten auf Basis von **Pep₃** beobachtet – eine Reduktion des relativen unlöslichen Anteils erreicht. Dies bedeutet, dass Wirkstoff abgegeben wurde, jedoch das Konjugat unerwünschte Nebeneffekte erzielt.

Wie die *Pal*-Derivate sind polysarkosinbasierte Konjugate aufgrund der *off-target* Aktivitäten nicht für die Anwendung in Neuroblastomazellen geeignet. Dennoch konnte das generelle Potential polysarkosinbasierter Konjugate durch die hohen Beladungskapazitäten und schnellen Freisetzungskinetiken gezeigt werden. Es sollte daher in weiteren Experimenten geprüft werden, ob sich das Transportsystem auf andere Zellsysteme übertragen lässt.¹⁹⁸ So sind für weitere biologische Tests die beladenen Pep-PEG Konjugate ohne weitere Modifikation am relevantesten, welche in den hier vorgestellten Experimenten mit unterschiedlichen Effekten auf die Tau-Inhibierung vielversprechende Ergebnisse lieferten.

3.9 Bibliotheksscreening eines anorganischen Bismut-oxido-Clusters

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebene Screening-Methode wurde zur Identifikation von Transportern für organische Wirkstoffe entwickelt und beschränkt sich damit auf einen klar definierten Einsatzbereich. Es bietet sich jedoch eine Vielzahl weiterer Einsatzmöglichkeiten der Peptidbibliotheken an, wie z. B. die Identifikation von Peptiden zur Komplexierung anorganischer Cluster. Dabei interagieren die Peptide, ähnlich wie bei organischen Wirkstoffen, sequenz- und strukturspezifisch mit den Clustern und binden diese. Über die Peptide können anschließend weitere Funktionalitäten eingeführt werden, z. B. um die Cluster zu solubilisieren oder auch für weitere kovalente Bindungen auszustatten. Im Folgenden soll der Einsatzbereich der Screening-Methode erweitert und zur Identifizierung spezifisch bindender Peptide für einen Bismut-oxido-Cluster genutzt werden.

Ein interessantes Anwendungsgebiet ist hierbei die quantitative Bioanalyse von Antikörpern in Gewebeschnitten, die eine frühzeitige Detektion und Behandlung von Krankheiten ermöglichen.¹⁹⁹⁻²⁰⁰ Über die Jahre wurden eine Vielzahl von analytischen Plattformen zur Quantifizierung und Visualisierung von Antikörpern entwickelt, wie z. B. die Dunkelfeldmikroskopie, die oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie oder auch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (Laser-Ablation (LA) ICP-MS).²⁰¹⁻²⁰⁶ Diese Methoden basieren auf einer Markierung der Antikörper mit Fluorophoren, Metallreagenzien oder Nanopartikeln. Die optischen Methoden zeigen hierbei den Nachteil, dass eine gleichzeitige Detektion verschiedener Fluorophore aufgrund überlappender Spektraleigenschaften oft nicht umsetzbar ist.²⁰⁷ Diese Möglichkeit der gleichzeitigen Detektion verschieden markierter Antikörper, auch Multiplexing genannt, ist jedoch hoch relevant und ist besonders für Systeme mit limitierter Probenmenge geeignet. LA-ICP-MS bietet hier eine Plattform, die durch Nutzung unterschiedlicher Metallmarkierungsreagenzien eine gleichzeitige Quantifizierung verschiedener Antikörper mit einer Submikrometer-Auflösung ermöglicht.²⁰⁸⁻²⁰⁹ Bei den Markierungsreagenzien handelt es sich hauptsächlich um trivalente Ionen der Lanthanoidgruppe, die mit Hilfe von Maleimid-DOTA (mDOTA) chelatisiert und durch das Maleimid-Thiol System an Antikörper gebunden werden. Gerade in der Bioanwendung sind diese Systeme geeignet, da die Lanthanoide

wegen des seltenen Vorkommens geringe Hintergrundsignale geben.²¹⁰⁻²¹¹ Obwohl diese Markierungsreagenzien weit verbreitet sind, zeigen sie ein gemeinsames Problem: Dadurch, dass nur ein Metallion pro Markierungsreagenz verwendet wird, ist die Sensitivität der Methode begrenzt. Dies hat bereits zur Entwicklung neuer, polymerbasierter Systeme geführt.²¹¹⁻²¹² Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Nutzung multinuklearer Metallcluster.^{vii} Diese müssen jedoch funktionalisiert werden, um eine Anbindung an Antikörper zu ermöglichen. Hierfür könnten sich Peptide eignen, da diese spezifisch mit den Metallclustern interagieren können. Ziel eines Screenings ist nun die Identifikation stark bindender Peptide, die durch Austausch von Liganden den Metallcluster nicht-kovalent binden und an Antikörper kuppeln können.

3.9.1 Konzept des Screenings

Der wasserlösliche Komplex $[\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{SO}_3\text{CF}_3)_6(\text{CH}_3\text{CN})_6] \cdot 2 \text{CH}_3\text{CN}$ (**MK1**) wurde als Zielmolekül für das Screening gewählt.²¹³ Dieser Metalloxo-Cluster besitzt sechs ^{209}Bi -Atome pro Markierungseinheit und verspricht damit eine deutliche Signalverstärkung im Vergleich zu den mono-nuklearen Lanthanoidmarkierungsreagenzien in LA-ICP-MS-Messungen. Weiterhin weist Bismut ein geringes natürliches Vorkommen und ein damit verbundenes geringes Hintergrundrauschen auf. Für das Screening zur Identifikation von stark bindenden Peptidsequenzen wurde die Peptidbibliothek **Bib2** gewählt, da diese in vorherigen Screenings gute Ergebnisse zeigte. Ähnlich wie in den Wirkstoffscreenings wurde die Bibliothek mit **MK1** inkubiert und nicht spezifisch bindende Clustermoleküle durch exzessives Waschen entfernt. Da **MK1** jedoch weder farbig noch fluoreszent ist, musste die Visualisierung der Wirkstoffanreicherungen über andere Wege erreicht werden. Die Behandlung der inkubierten Bibliothek mit H_2S zeigte gute Ergebnisse, da der Schwefelwasserstoff **MK1** zum Reduktionsprodukt Bi_2S_3 zersetzt und damit clusterreiche Harzkügelchen schwarz färbt. Dabei war eine automatisierte Analyse einer immobilisierten Bibliothek nicht möglich, da die Anwendung eines Mikroarray-Scanners

^{vii} Das Projekt wurde in Kooperation mit MONA BAUER, Humboldt-Universität zu Berlin, Arbeitskreis Prof. LIMBERG, Koordinationschemie/Katalyse, durchgeführt.

nur für fluoreszente Zielmoleküle geeignet ist. Es wurde daher entschieden die inkubierte Bibliothek manuell unter einem Durchlichtmikroskop zu analysieren.

3.9.2 Identifizierung von Cluster-Bindern

Die photolabile **Bib2** wurde mit 0.1 mg/mL **MK1** in Reinstwasser inkubiert und anschließend ausgiebig gewaschen, um nicht-spezifisch gebundenen Cluster zu entfernen. Nach Behandlung der Bibliothek mit H_2S zeigten sich im Durchlichtmikroskop deutlich gefärbte (positive Treffer) und transparente (negative Treffer) Harzkügelchen, die manuell separiert wurden (Abbildung 45). Dabei zeigten ca. 5 % der untersuchten Bibliothek eine deutliche Verfärbung, was für eine spezifische Interaktion des Clusters mit den Peptiden spricht. Insgesamt wurden 90 positive Treffer und 49 negative Treffer ausgewählt, um eine umfassende Bindungsmotivuntersuchung durchzuführen (siehe Kapitel 6.1). Die Peptide wurden mittels UV-Licht von der Festphase abgespalten, wobei Bi_2S_3 im Kern der Harzkügelchen blieb und durch Zentrifugieren entfernt werden konnte. Anschließend wurden die Peptide im MALDI-ToF-MS² sequenziert. Hierbei wiesen die **MK1** bindenden Peptidsequenzen einen hohen Prozentsatz an Glutaminsäure auf ($\approx 35\%$), wohingegen die restlichen Aminosäuren geringere Vorkommen zeigten ($< 15\%$). Die nicht-bindenden Peptidsequenzen bestätigen diesen Trend mit einem geringen Vorkommen von Glutaminsäure ($< 5\%$, gegenüber 14 % bei einer statistischen Verteilung) und einem hohen Anteil

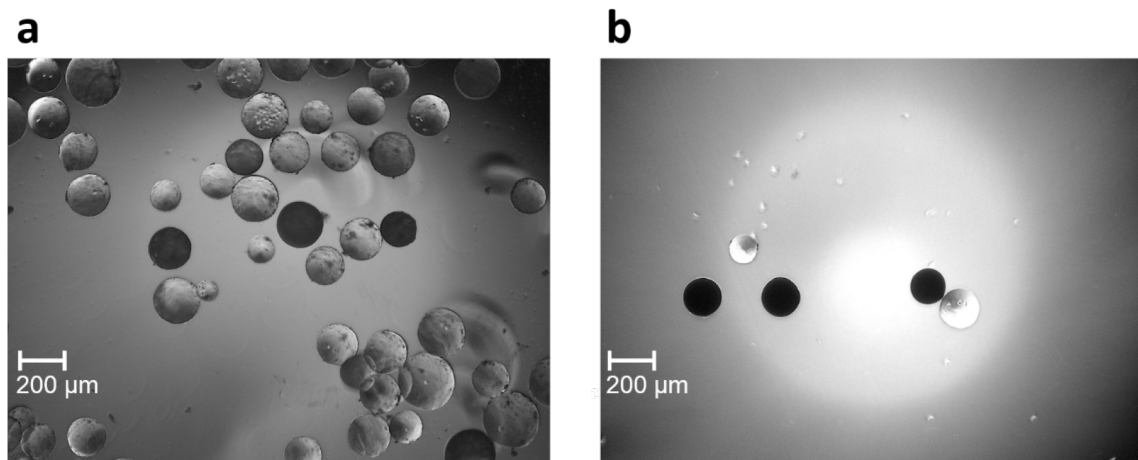


Abbildung 45. Mit **MK1** inkubierte **Bib2** nach Behandlung mit H_2S im Durchlichtmikroskop. Ausschnitt der vollen Bibliothek (a) und ein Ausschnitt von positiven und negativen Treffern im direkten Vergleich (b).

von Lysin ($\approx 22\%$). Interessanterweise wiesen 60 % der bindenden Sequenzen Glutaminsäure als *N*-terminale Aminosäure auf, was durch eine gute Solvatisierung der Peptidsequenzen und der damit einhergehenden verbesserten Zugänglichkeit begründet werden kann. Im Gegensatz dazu wiesen 63 % der nicht-bindenden Sequenzen Lysin als *N*-terminale Aminosäure auf, die offensichtlich Wechselwirkungen unterdrückt. Bei weiterer Bindemotivuntersuchung fällt auf, dass Glutaminsäure in den bindenden Sequenzen zumeist in separierten und nicht blockähnlichen Positionen auftritt. Diese Abstände erhöhen möglicherweise die Flexibilität der Sequenzen und unterstützen die Bindegeometrie, wobei ebenfalls multivalente Bindeeffekte auftreten können. Interessanterweise wurden sowohl für Binder, als auch für nicht-Binder Sequenzen identifiziert, die einzelne Glutaminsäuren beinhalten. Dies unterstützt die These, dass die vollständige Sequenz für die Bindung entscheidend ist und nicht einzelne Aminosäuren. Es gilt jedoch festzuhalten, dass Glutaminsäure der entscheidende Faktor für eine Bindung zu sein scheint. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da in der Literatur bereits beschrieben ist, dass die Triflatliganden von **MK1** durch Carbonsäuren ausgetauscht werden können.²¹³ Eine vielversprechende Cluster-Bindesequenz (**CBS**), bestehend aus ESKGKLE, wurde für weitere Experimente ausgewählt. Diese Peptidsequenz repräsentiert die Aminosäureverteilung des durchgeführten Screenings: **CBS** präsentiert zwei Glutaminsäuren C- & N-terminal, die durch fünf Aminosäuren getrennt sind. Ein zentrales Glycin erhöht zudem die Flexibilität des Peptids, was möglicherweise die Bindefähigkeit verbessert. **CBS** wurde durch die Fmoc-Strategie an einem Rink-Amid-Harz synthetisiert und nach Abspaltung und Aufreinigung als gut wasserlösliches Peptid erhalten. Um die Interaktion der Peptidsequenz mit **MK1** zu bestätigen wurde eine ^1H -NMR Titration durchgeführt. Dabei wurde das gelöste Peptid (2 mM) vorgelegt und **MK1** (1/30 Äq. – 1/6 Äq.) schrittweise zur Lösung gegeben. Hierbei zeigten die Signale der H_γ und H_β Atome der Glu1 und Glu7 Seitenketten kontinuierliche chemische Verschiebung bis insgesamt $\Delta\delta = 0.05$ ppm (Abbildung 46). Diese liegen den Bindungsfunktionalitäten am nächsten und erfahren deshalb eine starke Veränderung des chemischen Umfeldes bei der Bindung des Clusters. Im Vergleich dazu zeigten die Signale der Seitenkettenprotonen der verbleibenden Aminosäuren keine Änderungen der chemischen Verschiebungen, was für eine geringere Interaktion spricht. Dies unterstreicht die

Wichtigkeit von Glutaminsäure für eine Komplexierung des Metallclusters. Die Titration wurde nach Zugabe von 1/6 Äq. **MK1** gestoppt, da es zur Bildung unlöslicher Aggregate kam, was die NMR-Signalintensität reduzierte. Dabei beginnen möglicherweise einzelne, bereits mit einer Glutaminsäure an dem Cluster gebundene Peptide mit einem weiteren Cluster zu interagieren. Diese ungewünschte Aggregationsbildung kann nur durch eine schnelle Zugabe eines Überschusses an Peptid unterdrückt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Komplexierung des Clusters dynamisch abläuft und keine optimal stabilisierte Komplexbildung stattfindet. Somit ist auch die Ausbildung definierter Komplexe unwahrscheinlich.

Als Negativkontrolle wurde eine Cluster-nicht-bindende Peptidsequenz (**CNS**) KLKLKKF ausgewählt und synthetisiert. Diese Sequenz spiegelt, ähnlich wie **CBS**, die Ergebnisse des Screenings wider und weist die für die Clusterkomplexierung ungünstigsten Aminosäuren auf. Wie erwartet zeigten die Signale der Seitenkettenprotonen in einem Titrationsexperiment gegen **MK1** keine Änderung der chemischen Verschiebungen, was

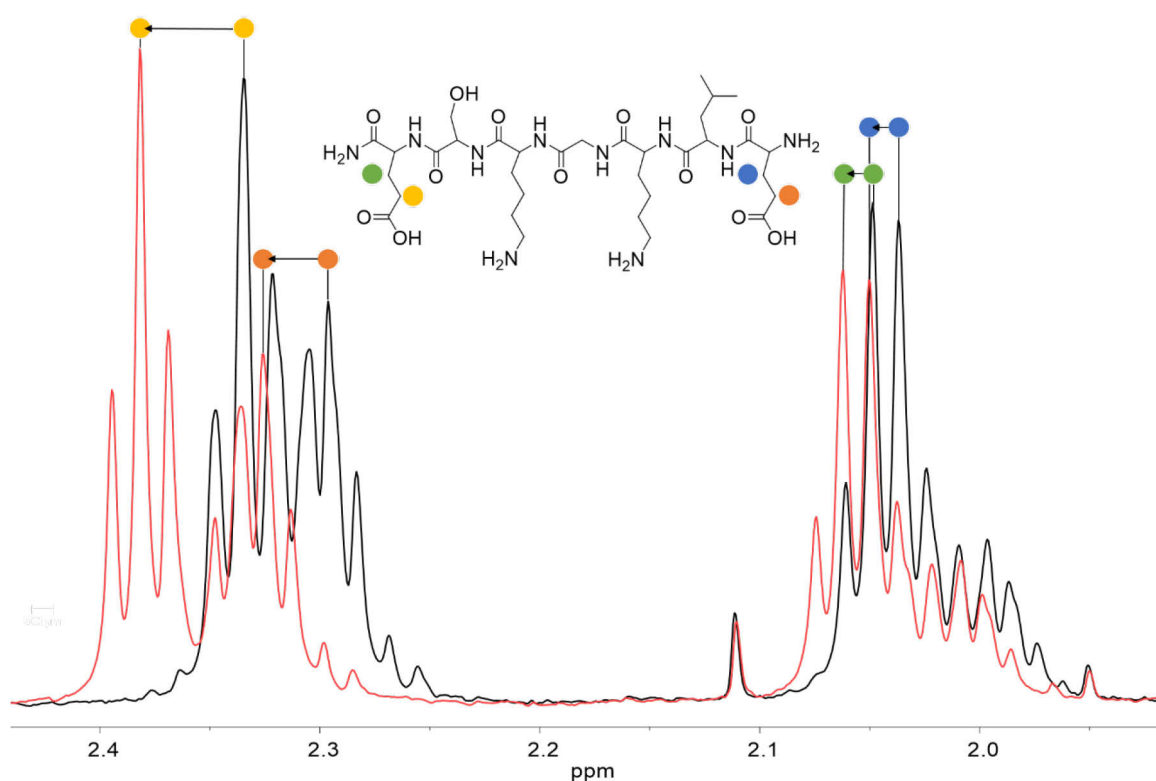


Abbildung 46. Seitenkettenprotonenbereich des ^1H -NMR Spektrums des Peptids **CBS** vor **MK1**-Zugabe (schwarz) und nach Zugabe von 1/6 äq. **MK1** (rot). Die Spektren wurden in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) aufgenommen.

für eine vernachlässigbare Interaktion spricht. Dies verifiziert indirekt die Ergebnisse des Bibliotheksscreenings und bestätigt die Auswahl der Peptidsequenzen.

Nachdem gezeigt wurde, dass **CBS** den Metalloxo-Cluster erfolgreich komplexiert, sollte **CBS** so funktionalisiert werden, dass eine kovalente Bindung an reduzierte Antikörperfragmente möglich ist. Da reduzierte Antikörperfragmente freie Thiole aufweisen, wurde sich für eine Peptidfunktionalisierung mit Maleimiden entschieden, welche chemoselektiv mit den Thiolen reagieren. Die Maleimidfunktionalität wurde über Festphasenpeptidsynthese eingefügt und **CBS-Mal** nach präparativer Aufarbeitung als weißes Pulver erhalten. Um die Reaktivität von **CBS-Mal** gegenüber Thiolen zu testen, wurde in einem weiteren NMR-Experiment **CBS-Mal** in Reinstwasser gelöst und 1 Äq. freies Cystein in Reinstwasser hinzugegeben. Anschließend wurden alle 2 min Spektren aufgenommen. Dabei konnte direkt nach Zugabe von Cystein die Protonensignale der Maleimid-Doppelbindung mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 6.75$ ppm nicht mehr detektiert werden. Die sofortige und vollständige Umsetzung verspricht gute Reaktivitäten auch gegenüber sterisch anspruchsvollen Thiolen und eignet sich daher für den Einsatz als Metallmarkierungsreagenz.

In einem letzten Experiment sollte nun die Signalverstärkung des komplexierten **MK1** im Vergleich zu mono-nuklearen Lanthanoidmarkierungsreagenzien getestet werden. Dazu wurde ein Experiment mit Thiol-funktionalisierten Objektträgern gewählt, da die direkte Modifizierung reduzierter Antikörper nur in aufwändigen Experimenten hätte durchgeführt werden können. Eine 2 mM **CBS-Mal** Lösung in 90 mM Ammoniumacetat (pH = 6.5) wurde auf die Objektträger aufgetragen und für 2 h inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit Reinstwasser gespült und eine 0.1 mM **MK1** Lösung auf dieselbe Stelle aufgetragen. Nach ausgiebigem Waschen wurde der Objektträger an der Luft getrocknet. Als Vergleichssubstanzen wurden ebenfalls **CNS-Mal** und **Tb-mDOTA** aufgetragen und analog behandelt. Der Objektträger wurde mittels LA-ICP-MS vermessen, wobei die Isotope ^{209}Bi und ^{159}Tb für die Detektion ausgewählt wurden. Der Laser hatte dabei einen Durchmesser von 250 μm und eine Messgeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m/s}$. Die Ablation resultierte dabei bei **CBS-Mal** in einer durchschnittlichen Signaldetektion von 1.77×10^7 cps

für ^{209}Bi und zeigt dabei eine 4.800-fach höhere Signalintensität als der unbehandelte Hintergrund (Tabelle 7). **CNS-Mal** hingegen zeigte eine durchschnittliche Signalintensität von 5.97×10^4 cps für ^{209}Bi und damit nur ein 16-fach höheres Signal. Tb wurde mit 4.50×10^4 cps für ^{159}Tb ebenfalls eindeutig identifiziert, konnte aber nur eine 180-fache Intensitätsverstärkung im Vergleich zum Hintergrund erreichen. Interessanterweise übertrifft **CBS-Mal** die theoretisch erwartete 6-fache Intensitätsverstärkung im Vergleich zu dem Tb-System um ein Vielfaches. Diese Beobachtung kann durch die nicht-stöchiometrische Komplexierung des Clusters in der dicht gepackten Peptidoberfläche begründet werden. Damit ist eine direkte Quantifizierung der Thiolfunktionalitäten schwierig, jedoch könnte dieses System auch als qualitativer Nachweis von Thiolen genutzt werden.

Tabelle 7. Ergebnisse der LA-ICP-MS-Messungen.

Verbindung	^{209}Bi cps	^{159}Tb cps	STD / %	Intensitätsverstärkung
CBS-Mal-1	1.77×10^7	-	1.9	4800
CNS-Mal-1	5.97×10^4	-	7.6	16
Tb-mDOTA	-	4.50×10^4	34.4	180

Es konnte gezeigt werden, dass der Ansatz mit einem polynuklearen Metallcluster zu einer deutlichen Intensitätsverstärkung in LA-ICP-MS-Messungen im Vergleich zu Lathanoidmarkierungsreagenzien führt. Weitere Test mit reduzierten Antikörpern müssen nun durchgeführt werden, um zu für Bioanwendungen relevanten Experimenten zu gelangen. Allerdings überstieg dies den Rahmen der Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Screening-Methode erfolgreich auf anorganische Zielmoleküle angewendet werden kann und damit eine Vielzahl verschiedener Anwendungsgebiete offenbart.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Peptid-Polymer-Konjugate stellen bereits seit einiger Zeit geeignete Formulierungsadditive für wasserunlösliche, niedermolekulare Wirkstoffe dar. Die Identifizierung spezifisch bindender Peptidsequenzen erfolgte dabei in einstufigen Screening-Verfahren von Peptidbibliotheken.⁹⁰ Wichtige Informationen wie z. B. Wirkstofffreisetzungseigenschaften wurden bisher während des Screening-Verfahrens nicht berücksichtigt, sodass eine Bestimmung dieser Eigenschaften nachträglich erfolgen musste. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Screening-Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, in einem mehrstufigen Verfahren sowohl Wirkstoffbindungs-, als auch Freisetzungseigenschaften zu ermitteln.

Durch Verwendung einer neuen Immobilisierungsstrategie konnte eine *on-chip* Lösung realisiert werden, die aufeinanderfolgende Inkubations-, Wasch- und Freisetzungsschritte auf einem Träger ermöglicht und somit individuelle Harzkügelchen unter verschiedenen Selektionsbedingungen analysieren kann. Wirkstoffanreicherungen wurden automatisiert mit einem Mikroarray-Scanner detektiert und die entsprechenden Peptidsequenzen nach dem Screening direkt auf den Harzkugeln mittels MALDI-MS sequenziert. Dabei konnte neben der klassischen Fragmentierung auch auf einen fragmentierungsfreien Sequenzierungsansatz zurückgegriffen werden. Hierzu wurde eine Leiterpeptidbibliothek genutzt, die aufgrund einer Zugabe Boc-Aminosäure während der Synthese definierte Abbruchsequenzen aufweist. In einem direkten Vergleich der beiden Sequenzierungsansätze zeigte die fragmentierungsfreie Methode mit 96 % korrekter Sequenzierung einen deutlichen Vorteil gegenüber der etablierten Fragmentierung, die nur 55 % korrekte Aminosäurezuordnung erreichte. Der Ausleseerfolg der fragmentierungsfreien Methode konnte bei der Sequenzierung von Präzisionspolymeren reproduziert werden, womit sich die Methode zur Sequenzierung verschiedenster Systeme eignet.

In einem Screening gegen den wasserunlöslichen, potentiellen ALZHEIMER-Wirkstoff BB17 aus der Arbeitsgruppe MANDELKOW wurden zuerst Peptidsequenzen identifiziert, die den Wirkstoff binden und diesen anschließend in einem vereinfachten Blutplasmamodell entweder langsam oder schnell freigeben. In UV/Vis-basierten Messungen zeigten die selektierten 7mer Peptid-PEG-Konjugate Beladungskapazitäten von 1:3.4 - 1:6.7 (mmol BB17/mmol Konjugat), womit die bereits bestehenden Systeme übertroffen wurden.⁴ Mittels Fluoreszenzanisotropie und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie konnten die Freisetzungseigenschaften der Konjugate in einem Blutplasmamodell bestätigt werden. Hierbei übertrag der schnellste Wirkstofffreisetzer 80 % des verfügbaren BB17 innerhalb von

10 min an BSA, während der langsamste Wirkstofffreisetzer 140 min benötigte. Alanin-Scans der Konjugate wiesen darauf hin, dass für schnelle Wirkstofffreisetzungen Wirkstoffanreicherungen an der Peptid/PEG-Grenzfläche vorteilhaft sind, wohingegen eine Zentrierung des Wirkstoffes im Aggregatkern zu langsamen Freisetzungen führt.

Zur weiteren Einstellung der Beladungs- und Freisetzungseigenschaften wurden verschiedene Modifikationen der Konjugate, wie z. B. Einbau eines hydrophoben Elements oder Verzweigung der Bindedomäne, überprüft. Hierbei konnten durch den Einbau eines Palmitinsäurerests die Beladungskapazitäten auf bis zu 1:2.0 (mmol BB17/mmol Konjugat) gesteigert werden, jedoch bei gleichzeitiger drastischer Reduktion der Freisetzungskinetiken. Ein Wechsel des löslichkeitsvermittelnden Polymers von PEG zu Polysarkosin resultierte in einem Konjugat mit einer Beladungskapazität von 1:1.2, unter Beibehaltung der Freisetzungseigenschaften des entsprechenden Pep-PEG Konjugats.

Die Wirkstoffsysteme sollen in einer späteren Anwendung die Tauaggregation in Neuronen inhibieren, welche für das Absterben der Gehirnzellen bei einer ALZHEIMER-Erkrankung mitverantwortlich sind. In ersten *in vitro* Experimenten zeigten die beladenen 7mer Pep-PEG Konjugate Effekte mit IC₅₀-Werten bis zu 3.3 µM. In Zelltests mit einer N2a-Zelllinie konnten sowohl Reduktionen der gesamten Tauexpression, als auch eine Verringerung der Taufilamente beobachtet werden. Dabei zeigte das Konjugat mit den schnellsten Freisetzungskinetiken die besten Ergebnisse mit einer effektiven Tauaggregatreduktion von 55 %. Während bei den modifizierten Konjugaten sowohl der Einbau eines hydrophoben Elements, als auch der Wechsel zu Polysarkosin zu *off-target* Reaktionen führten, resultierte die Verzweigung der Bindedomäne in einer Tauaggregatreduktion von 60 %.

In einem weiteren Schritt konnte der Anwendungsbereich des Screenings auf anorganische Fragestellungen erweitert werden, womit sich neue Möglichkeiten für Wirkstoffscreenings bieten. Hierbei wurden bindende Peptide für einen Metalloxido-Cluster identifiziert, welcher als polynukleares Metallmarkierungsreagenz verwendet werden kann. Im Vergleich zu klassischen, mononuklearen Lanthanoidmarkierungsreagenzien in LA-ICP-MS-Experimenten führte dieser zu einer 26-fachen Intensitätsverstärkung.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Screening-Methode bietet aufgrund der Mehrstufigkeit Potential für die Selektion von Formulierungsadditiven mit weiteren biologisch relevanten Eigenschaften. So ist die Identifizierung von Peptidsequenzen denkbar, die Wirkstoffe unter physiologischen Bedingungen halten und transportieren, aber gezielt in reduktiven

oder sauren Medien freisetzen. Somit wäre ein aktives *targeting* ohne den Einbau zusätzlicher, spaltbarer Bausteine möglich. Eine Erweiterung der Methode auf Raman-aktive Wirkstoffe ist zudem möglich, womit sich das Einsatzgebiet des Screenings nicht nur auf fluoreszente Wirkstoffe beschränkt.⁹²

Die genauen Aufnahmemechanismen der Wirkstoff-Transporter-Aggregate sind weitestgehend ungeklärt und bieten Potential für weitere Untersuchungen. Beispielsweise könnten Modifikationen der Aggregate mit zellpenetrierenden Peptiden (eng.: *cell-penetrating peptides*, CPP) wie Polyarginin oder dem Tat-Peptid die Aufnahme der Aggregate über Endozytose verbessern und somit mehr Wirkstoff in die Zellen schleusen.²¹⁴⁻²¹⁵ Die Anbindung der CPP müsste dabei in wässriger Lösung erfolgen, um nur die PEG-Außenhülle zu funktionalisieren. Dies könnte durch die Verwendung einer *strain-promoted* kupferfreien Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) realisiert werden.²¹⁶ Auch die Anbindung monoklonaler Antikörper an die Außenhülle der Aggregate ist denkbar, womit der Schritt zu Immuno-Aggregaten möglich wäre. Diese hätten das Potential die Aggregate in *in vivo* Experimenten bis in die Neuronen zu schleusen.

In Anbetracht des proteolytischen Abbaus der Konjugate könnte ein Übergang auf synthetische Polymere als Bindedomäne vorteilhaft sein. Dabei könnten die aus den Screenings gewonnenen Informationen direkt in das Design peptidomimetischer Polymere fließen oder aber eigenständige Screenings durchgeführt werden. Dies erfordert den Aufbau einer synthetischen Polymer-Bibliothek aus einem synthetischen Monomeralphabet. Die Reaktionen müssen dabei quantitativ ablaufen, um die Konzentration an Abbruchsequenzen gering zu halten. Ein Auslesen der Polymersequenzen wäre über klassische Fragmentierung oder über die fragmentierungsfreie Sequenzierung möglich. Dies könnte Formulierungsadditive realisieren, die eine erhöhte Stabilität bei einer Anwendung in Biosystemen aufweisen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Anbieter
Acetonitril, 99.9 %, <i>LC-MS grade</i>	VWR International (Darmstadt, GER)
Ameisensäure, <i>Fluka</i> für MS, 98 %	Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
Aminomethyl-ChemMatrix®-Harz	Sigma Aldrich
Aminosäuren:	
Fmoc-AA-OH	IRIS Biotech GmbH (Marktrechwitz, GER)
Boc-AA-OH	Novabiochem (Darmstadt, GER)
Bernsteinsäureanhydrid	VWR
Bromcyan (BrCN), 97 %	Sigma Aldrich
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (α -CHCA)	Sigma Aldrich
Dichlormethan (DCM), <i>peptide grade</i> , über CaH ₂ getrocknet (DCM)	IRIS Biotech GmbH
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 99 %	Sigma Aldrich
Diisopropylethylamin (DIPEA), <i>peptide grade</i>	Acros Organics (Geel, BEL)
Dimethylsulfoxid (DMSO), 99 %	Sigma Aldrich
Essigsäureanhydrid, <i>ReagentPlus</i> , >98 %	Sigma Aldrich
Ethandithiol (EDT)	Sigma Aldrich
2,2'-(Ethyldioxy)bis(ethylamin)	Sigma Aldrich
Fmoc-Photolinker-OH	IRIS Biotech
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	IRIS Biotech
Fmoc-Rink-Amid AM Polystyrol-Harz, Beladung 0.79/0.59 mmol/g	IRIS Biotech
Fmoc-Gly-Wang-Harz, Beladung: 0.84 mmol/g	Sigma Aldrich

HBTU	IRIS Biotech
HOBt	IRIS Biotech
Kolliphor® EL	Sigma Aldrich
N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), <i>peptide grade</i> , filtriert	IRIS Biotech
Palmitinsäure, >99 %	Sigma Aldrich
PEG1000	Acros Organics
Piperidin, <i>peptide grade</i>	Acros Organics
PyBOP	Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA)
Rinderalbumin (BSA), Fraktion V	Sigma Aldrich
TentaGel PAP-Harze: M _n = 3200 g/mol, Beladung: 0.25 mmol/g M _n = 850 g/mol, Beladung: 0.52 mmol/g M _n = 5000 g/mol, Beladung: 0.17 mmol/g	Rapp Polymere (Tübingen, GER)
Thiol-Objektträger	PolyAn (Berlin, GER)
Triethylsilan (TES), 98 %	Alfa Aesar (Karlsruhe, GER)
Trifluoressigsäure (TFA), <i>peptide grade</i>	Acros Organics
TFA-d ₁ , 99.5 atom % D	Acros Organics
Reinstwasser	Reinstwassersystem Laborstar SG Water

Alle Chemikalien wurden wie erhalten verwendet. Der Metallcluster $[\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{SO}_3\text{CF}_3)_6(\text{CH}_3\text{CN})_6] \cdot 2 \text{CH}_3\text{CN}$ (**MK1**) wurde freundlicherweise vom Arbeitskreis von Prof. LIMBERG (HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

5.2 Synthese von BB17

Die Synthese von BB17 wurde aus der Vorschrift von BULIC *et al.* adaptiert.³ Piperidin (0.2 mmol, 20 μ L) wurde zu einer Lösung aus 5-((4-1H-Pyrrol-1-yl)phenyl)furan-2-carbaldehyd (0.1 mmol, 23.7 mg) und 3-((1H-Benzimidazol-2-yl)methyl)-2-thioxothiazolidin-4-on (0.1 mmol, 26.3 mg) in trockenem DCM (10 mL) gegeben und die Mischung für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das rötliche Präzipitat wurde abfiltriert, mit Reinstwasser gewaschen und aus Aceton/Reinstwasser umkristallisiert. Das Produkt wurde als orangenes Pulver mit einer Ausbeute von 80 % erhalten (siehe Kapitel 6.2).

5.3 Synthese von Fmoc-Mini-PEG-OH

Die Synthese von Fmoc-Mini-PEG-OH wurde aus der Vorschrift von SORIANO *et al.* adaptiert.²¹⁷ 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamin) (10.0 mL, 68.3 mmol, 1 Äq.) wurde in einem Kolben vorgelegt und in ACN (340 mL) gelöst. Zu der farblosen Lösung wurde eine vorher hergestellte Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid (6.83 g, 68.3 mmol, 1 Äq.) in ACN (170 mL) über etwa 60 min unter Rühren langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich eine farblose wachsartige Substanz am Kolbenboden absetzte. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und die Substanz in einem Lösungsmittelgemisch aus ACN und Reinstwasser (1:1, v/v, 700 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und der pH-Wert durch Zugabe von etwa 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH = 8 eingestellt. Anschließend wurde eine Lösung aus Fmoc-Cl (22.99 g, 88.9 mmol, 1.3 Äq.) in ACN (70 mL) über etwa 45 min unter Rühren im Eisbad langsam zugetropft. Nach der Zugabe wurde mit ca. 5 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung wieder pH = 8 eingestellt und die nun trübe, leicht gelbliche Mischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde unter vermindertem Druck eingengt und die wässrige Phase mit etwa 15 mL 1 M HCl-Lösung auf pH = 2 eingestellt. Anschließend wurde aus der wässrigen Phase viermal mit 250 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen zweimal mit 400 mL Reinstwasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt (gelbe ölige Flüssigkeit) säulenchromatographisch gereinigt (500 mL

EtOAc, dann EtOAc : MeOH, v/v 9 : 1 + 0.1 % TFA). Nach Gefriertrocknen am Hochvakuum wurde 1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecan-17-säure als farbloser Feststoff erhalten (2.40 g, 5.1 mmol, 7.5 % Gesamtausbeute, siehe Kapitel 6.2).

5.4 Synthese der *Split&Mix* Peptidbibliotheken

Die Peptidbibliotheken **Bib1**, **Bib2** und **Bib3** (Abbildung 47, a-c) wurden manuell über das festphasengebundene Peptidsyntheseprotokoll hergestellt. Als feste Phase wurde das Polyethylenglycol-basierte Aminomethyl-ChemMatrix®-Harz mit einer Beladung von 1.0 mmol/g gewählt. Die Ansatzgrößen betrugen jeweils 1.5 mmol, womit eine ausreichende Anzahl an Harzkügelchen (ca. 1.4×10^6) vorhanden war, um mindestens eine Kopie jeder theoretisch möglichen Peptidsequenz (ca. 0.8×10^6) zu realisieren. Alle Bibliotheken bestehen aus einer spaltbaren Linker-Einheit, einer Spacersequenz und einem randomisierten 7mer-Peptidsegment. Die Kupplung der einzelnen Bausteine erfolgte nach Standard-Fmoc-Protokoll. Vor Beginn der Synthese wurden die in Spritzenreaktoren befindlichen Harze 30 min in NMP vorgequollen, um die Erreichbarkeit der Amin-Funktionalitäten zu gewährleisten.

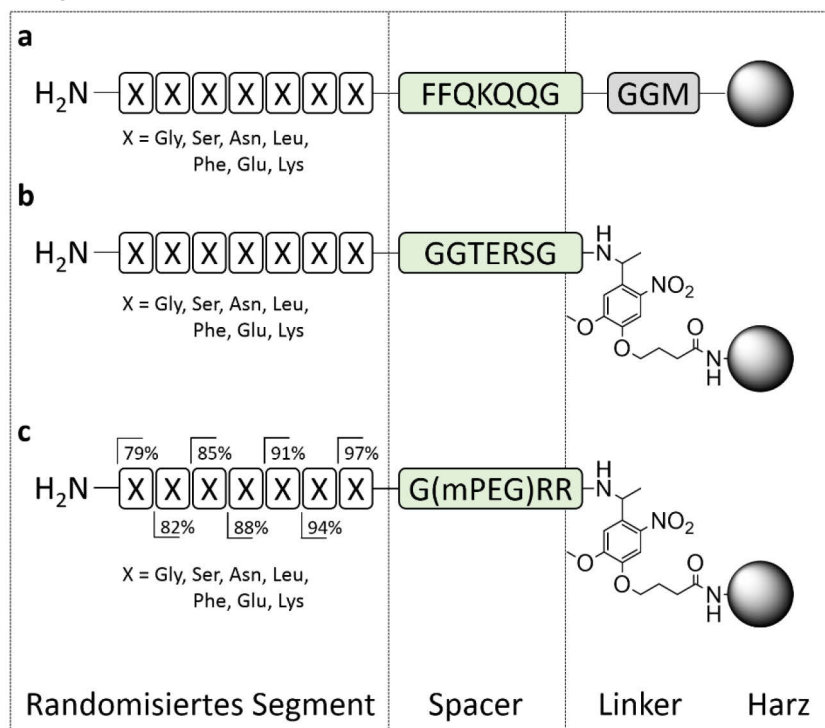


Abbildung 47. Aufbau der Peptidbibliotheken für Screenings gegen niedermolekulare Wirkstoffe. **Bib1** enthält einen Methionin-Linker und eine erweiterte Bindungsdomäne als Spacer (**a**), **Bib2** einen photolabilen Linker und Fragmentierungs-/Ionisierungsverstärker als Spacer (**b**) und **Bib3** (Abbruchsequenzenbibliothek) ebenfalls einen photolabilen Linker und Ionisierungsverstärker als Spacer (**c**).

Für die Synthese von **Bib1** (Abbildung 47, a) wurde die Aminosäure Fmoc-Met-OH als Linker gewählt. Hierzu wurde Fmoc-Met-OH (10 Äq., 15 mmol) in NMP gelöst und mit PyBOP (10 Äq., 15 mmol) versetzt. Zur Voraktivierung der Aminosäure wurde DIPEA (20 Äq., 30 mmol) zur Lösung hinzugegeben und kurz geschüttelt. Die klare Lösung wurde in den mit Harz beladenen Spritzenreaktor aufgezogen und für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend verworfen und ohne weiteres Waschen des Harzes eine zweite Kupplung durchgeführt. Dazu wurde erneut Fmoc-Met-OH (5 Äq., 7.5 mmol) mit PyBOP (5 Äq., 7.5 mmol) und DIPEA (10 Äq., 15 mmol) gelöst und in den Spritzenreaktor aufgezogen. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht auf dem Schütteltisch. Nach Verwerfen der Reaktionslösung wurde das Harz gewaschen (3 × NMP, 2 × DCM, 2 × NMP) und nicht abreagierte Amin-Funktionalitäten mit 20 % (v/v) Essigsäureanhydrid in NMP acetyliert (2 × 10 min). Das Harz wurde erneut gewaschen (3 × NMP, 2 × DCM, 2 × NMP) und ein Kaisertest durchgeführt, um die Vollständigkeit des Acetylierens zu überprüfen. Hierzu wurden einige Harzkügelchen in ein Probengefäß überführt und mit jeweils einem Tropfen Ninhydrin-Lösung (500 g/L in Ethanol), Phenol-Lösung (4 kg/L in Ethanol) und Pyridin-Lösung (1 mM KCN-Lösung in Pyridin) versetzt. Die Probe wurde nach Erwärmen für 30 s auf 80 °C auf einen violetten Farbumschlag überprüft. Ein Ausbleiben der Verfärbung der Harzkügelchen zeigte hierbei eine erfolgreiche Acetylierung und Abwesenheit von Amin-Funktionalitäten an. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch Behandlung mit 20 % (v/v) Piperidin in NMP (3 × 10 min) entfernt. Die Abspaltlösungen wurden gesammelt, vereinigt und die spezifische 9-Dibenzofulven-Piperidin-Addukt Stoffmenge mittels UV/Vis-Spektroskopie bei 301 nm bestimmt. Hierzu wurde das Lambert-Beersche Gesetz verwendet, wobei ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{(301\text{ nm})} = 8100\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ gewählt wurde (Gleichung 1).²¹⁸

$$n_{Dbf(301\text{ nm})} = \frac{A * V_{gesamt}}{D * \epsilon_{(301\text{ nm})}}$$

Gleichung 1: Bestimmung der Dibenzofulven-Piperidin-Addukt-Stoffmenge (n_{Dbf}) mit der Absorption (A), Gesamtvolumen (V_{gesamt}), Verdünnungsfaktor (D) und dem Extinktionskoeffizienten bei 301 nm ($\epsilon_{(301\text{ nm})}$).

Nach erfolgreicher Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz gewaschen ($3 \times \text{NMP}$, $2 \times \text{DCM}$, $2 \times \text{NMP}$) und die Spacersequenz Phe-Phe-Gln-Lys-Gln-Gln-Gly-Gly-Gly schrittweise an die Festphase gekuppelt, indem die entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäuren (10 Äq./5 Äq.) mit PyBOP (10 Äq./5 Äq.) und DIPEA (20 Äq./10 Äq.) für 2 h/über Nacht jeweils doppelt gekuppelt wurden. Jeder Aminosäurekupplung folgte ein Acetylierungsschritt und die Fmoc-Abspaltung, sowie die Überprüfung der erfolgreichen Umsetzung mittels UV/Vis-Spektroskopie. Für die Synthese des randomisierten Abschnitts der Aminosäuresequenz wurde das Fmoc-entschützte Harz in sieben Aliquote aufgeteilt und in separate Spritzenreaktoren überführt (*Split*). Jedes Aliquot wurde mit einer der sieben Fmoc-geschützten Aminosäuren Gly, Ser, Asn, Leu, Phe, Glu und Lys wie bereits beschrieben für 2 h/über Nacht doppelt gekuppelt (10 Äq./5 Äq.). Anschließend wurden die einzelnen Aliquote erneut in einem Spritzenreaktor vereinigt (*Mix*), acetyliert und die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Durch diese Schritte wurde sichergestellt, dass es zu einer ausreichenden Vermischung der Harzkügelchen in dem Spritzenreaktor kommt. Nach erneuter Aufteilung der Harzkügelchen in sieben Aliquote wurden die nächsten für den randomisierten Block benötigten Aminosäuren gekuppelt. Diese Schritte wurden bis zur Fertigstellung der 7mer-Bibliothek wiederholt. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde die finale Beladung von ca. 0.81 mmol/g bestimmt. Das Harz wurde gewaschen ($3 \times \text{NMP}$, $5 \times \text{DCM}$), getrocknet und mit 20 mL einer Mischung aus 94 % TFA, 2.5 % EDT, 2.5 % TES und 1 % Reinstwasser für 4 h behandelt, um die permanenten Schutzgruppen zu entfernen. Die Bibliothek wurde ausgiebig mit DCM gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

Für die Synthese von **Bib2** (Abbildung 47, b) wurde der photolabile Linker Fmoc-Photolinker-OH (4-(4-(1-(9-Fluorenylmethoxycarbonylamino)ethyl)2-methoxy-5-nitro-phenoxy)-buttersäure) gewählt. Um spontane Degradierung des Linkers zu vermeiden, wurden alle Kupplungen unter Lichtausschluss durchgeführt. Anders als bei der Synthese von **Bib1** wurden zur Doppelkupplung des Linkers reduzierte Äquivalente von Fmoc-Photolinker-OH (1/0.5 Äq., 1.5/0.75 mmol), PyBOP (1/0.5 Äq., 1.5/0.75 mmol) und DIPEA (2/1 Äq., 3/1.5 mmol) für 2 h/über Nacht genutzt. Anschließend wurde das Harz acetyliert

und ein Kaisertest durchgeführt. Als Spacersequenz wurde Gly-Gly-Thr-Glu-Arg-Ser-Gly schrittweise an das Harz gekuppelt und der randomisierte *7mer*-Abschnitt der Aminosäuresequenz mit den Aminosäuren Gly, Ser, Asn, Leu, Phe, Glu und Lys über *Split&Mix* hergestellt. Die Entschützung der permanenten Schutzgruppen erfolgte mit 95 % TFA, 4 % TES und 1 % Reinstwasser für 3 × 4 Stunden, um die Pbf-Schutzgruppe vollständig zu entfernen. Die Bibliothek wurde ausgiebig mit DCM gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

Analog zur Synthese von **Bib2** wurde für **Bib3** (Abbildung 47, c) der photolabile Linker Fmoc-Photolinker-OH verwendet. Die Spacersequenz bestehend aus mPEG-Arg-Arg wurde schrittweise an die Festphase gekuppelt, indem die entsprechende Fmoc-geschützten Aminosäuren/mPEG (10 Äq./5 Äq.) mit PyBOP (10 Äq./5 Äq.) und DIPEA (20 Äq./10 Äq.) für 2 h/über Nacht doppelt gekuppelt wurden. Ein zusätzliches Glycin wurde als erstes Abbruchsegment durch Doppelkupplung von 97 % Fmoc-Gly-OH (9.7 Äq., 4.8 Äq.) und 3 % Boc-Gly-OH (0.3 Äq., 0.15 Äq.) eingeführt. Nach Acetylierung und Fmoc-Entschützung wurde der randomisierte *7mer*-Abschnitt der Aminosäuresequenz mit den Aminosäuren Gly, Ser, Asn, Leu, Phe, Glu und Lys durch *Split&Mix* hergestellt. Um definierte Abbruchsequenzen zu erhalten wurden, wie bereits am Glycin erläutert, definierte Mengen an entsprechender Boc-Aminosäure zur Kupplungslösung hinzugegeben. Hierbei sollte der prozentuale Anteil der einzelnen Abbruchsequenz gleichbleibend 3 % an der gesamten Bibliothek entsprechen, was eine Erhöhung des Boc-Aminosäureanteils in der Kupplungslösung von 3.1 % auf 3.8 % (erste Kupplung *vs.* siebte Kupplung) nötig machte. Die Abnahme des Beladungsgrades des Harzes während der Synthese konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden. Die Entschützung der permanenten Schutzgruppen erfolgte mit 95 % TFA, 4 % TES und 1 % Reinstwasser für 3 × 4 Stunden, gefolgt von Waschschritten und abschließendem Trocknen.

Alle Bibliotheken wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C/-20 °C gelagert.

5.5 Screening gegen nicht-immobilisierte Bibliotheken

Die Peptidbibliothek **Bib1** wurde in NMP vorgequollen und anschließend über Nacht mit einer Wirkstofflösung (0.1 mg/mL BB17 in DMSO/Reinstwasser 1:1, v/v) bei Raumtemperatur in einem Spritzenreaktor inkubiert. Die Inkubationslösung wurde anschließend verworfen und das Harz mit DMSO:Reinstwasser (1:1, v/v) gewaschen, gefolgt von weiteren Waschschritten mit Reinstwasser. Die Bibliotheken wurden als Suspension auf eine transparente Petrischale gebracht und die Anreicherung der Wirkstoffe in den Harzkügelchen mittels *Zeiss-Axio-Fluoreszenzmikroskop* (*Carl Zeiss MicroImaging GmbH*, 07745 Jena, GER), analysiert. Dieses Mikroskop ist ausgestattet mit einer *HAL 100* Durchlichtquelle, einer *AxioCam MRm* und einer Beleuchtungseinrichtung *HXP120C* Quecksilberdampfampe (*Leistungselektronik Jena GmbH*, 07747 Jena, GER). Zur Analyse der BB17 Anreicherungen wurde das *Zeiss Filter Set 43 HE* (Cy3, orange, Anregung: 537 – 563 nm, Strahlleiter: 570 nm und Emission: 570 – 640 nm) genutzt. Die Aufnahmen der Durchlicht- und Fluoreszenzbilder wurden mit der Software *Zeiss Axio Vision* ausgewertet. Identifizierte Harzkügelchen wurden manuell unter der Zuhilfenahme einer 20 µL Eppendorfpipette unter dem Fluoreszenzmikroskop separiert und in einzelne PCR-Gefäße transferiert. Zur Abspaltung der Peptidsequenzen wurden die Harzkügelchen der **Bib1** mit 20 µL einer Bromcyanlösung versetzt (20 mg/mL in 0.1 M HCl) und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösungen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Zur Sequenzierung wurden die Proben in einer Lösung aus ACN:Reinstwasser (1:1, v/v + 0.1 % TFA) gelöst und für die Sequenzierung mit α -CHCA Matrix (7 mg/mL in der MALDI-Lösung) auf ein MALDI-Probenträger aufgetragen. Dazu wurden 1.5 µL der Matrix vorgelegt und 1.5 µL der Probenlösung dazugegeben. Die Lösungen wurden gut durchmischt, um eine homogene Verteilung des Analyten in der Matrix zu erhalten. Für die Ergebnisse der MALDI-Messungen siehe Kapitel 6.1.

5.6 Immobilisierung der Peptidbibliotheken

Für die permanente Immobilisierung der Peptidbibliotheken auf Objektträgern wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Methode 1: Die getrocknete Peptidbibliothek wurde auf einer Silikonmatte verrieben, um Agglomerationen der Harzkügelchen aufzubrechen und eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Ein ITO-Objektträger wurde mit einer dünnen Schicht handelsüblichem Sekundenkleber (Alkylcyanoacrylat) bestrichen und anschließend auf die verteilte Peptidbibliothek gedrückt. Nach Lösen von der Silikonmatte wurde der Objektträger über Nacht getrocknet. Nicht fest adhärierte Harzkügelchen wurden mittels Druckluft von der Oberfläche entfernt.

Methode 2: Ein konventioneller Objektträger wurde mit einem doppelseitigen, elektrisch leitenden Klebeband modifiziert. Der Objektträger wurde in einem speziell angefertigten Halter befestigt und ein Stahlsieb mit einer Maschenweite von $150\mu\text{m}/200\mu\text{m}$ auf die mit dem Klebeband beschichtete Oberseite gedrückt. Die trockne Peptidbibliothek wurde auf das Sieb gegeben und manuell verrieben, wobei die Harzkügelchen sich in den Maschen des Siebs verteilten. Nach leichtem Andrücken der Harzkügelchen wurde das Sieb entfernt und der Objektträger mit Druckluft behandelt. Anschließend wurde der Objektträger für drei Tage getrocknet (Abbildung 48).

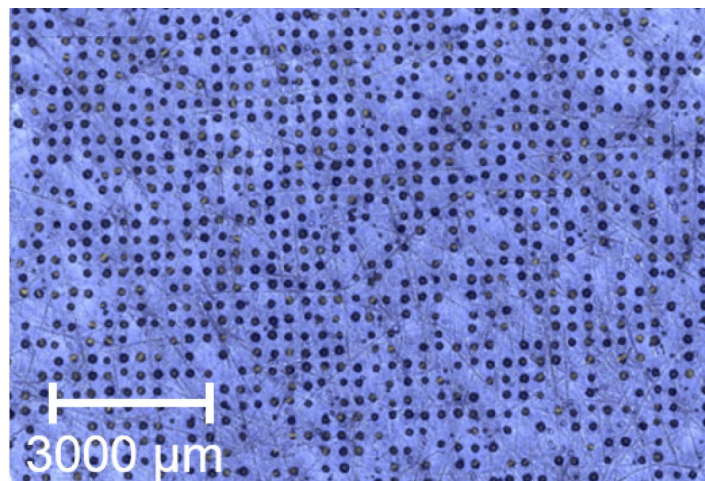


Abbildung 48. Repräsentative Lichtmikroskopaufnahme eines Ausschnitts einer immobilisierten Peptidbibliothek nach **Methode 2**.

5.7 Screening gegen immobilisierte Bibliotheken

Die nach 5.6 immobilisierten Peptidbibliotheken wurden in DMSO:Reinstwasser (1:1, v/v) vorgequollen und mit einer Wirkstofflösung (0.1 mg/mL BB17 in DMSO:Reinstwasser 1:1, v/v) über Nacht bei Raumtemperatur in einer Petrischale inkubiert. Die Ob-

jektträger wurden dabei komplett von der Inkubationslösung bedeckt. Zur guten Durchmischung wurde die Petrischale auf einen Orbitalschüttler gestellt und bei 30 rpm geschüttelt. Nach Inkubation wurden die Objektträger aus der Lösung entfernt und mit DMSO:Reinstwasser (1:1, v/v) 2×5 min gewaschen, um unspezifisch gebundenen Wirkstoff zu entfernen. Die Anreicherung des Wirkstoffes an den Harzkügelchen wurde durch Fluoreszenzmessungen an einem Microarray-Scanner MArS (Ditabis AG, Pforzheim, GER) durchgeführt. Dieser ist mit einem Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 532 nm (Cy3) ausgestattet und detektiert Floreszenzen mit einer Wellenlänge ≥ 580 nm. Die Auflösung der Messung erreicht bis zu 10 μm . 38 % Detektorsensitivität erwiesen sich als optimal. Die Messungen erfolgten im *rapid mode* (eng.: schneller Messmodus), um zum einen die Harzkügelchen nicht auszutrocknen, zum anderen, um den Photolinker nicht unnötig zu bestrahlen. Die Objektträger wurden anschließend zurück in eine Petrischale überführt, mit einer BSA-Waschlösung (50 mg/mL BSA in Reinstwasser) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach anschließendem Waschen in Reinstwasser wurden die Objektträger erneut im Microarray-Scanner vermessen. Die Objektträger wurden unter Lichtausschluss getrocknet und zur Abspaltung der Peptide von der Festphase für 2 h unter einer UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 356 nm bestrahlt. Die Matrixauftragung erfolgte mit einer *Airbrush*-Pistole mit einer α -CHCA-Lösung (10 mg/mL) in einer Reinstwasser:ACN Mischung (1:1, v/v + 0.1 % TFA) gelöst und aus ca. 20 cm Entfernung mit einer *Agora-Tec Airbrush*-Pistole auf den Objektträger gesprüht.

5.8 Sequenzierung der Peptide

Die Sequenzierung der Peptide wurde an einem Bruker Autoflex III SmartbeamTM (Bruker Daltonics GmbH, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Dieses ist mit einem N₂-MALDI-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einem Time-of-Flight (ToF) Detektor ausgestattet. Die Spektren der Präkursorionen wurden im Reflektronmodus mit 500 Laserschüssen aufgenommen. Zur Fragmentierung der Peptide wurden die Präkursorionen in eine mit Argon gefüllte Kollisionskammer geleitet. Das ausgewählte Massenfenster wurde auf $m/z = \pm 10$ festgelegt. Zur Erhöhung der Fragmentintensitäten wurden im

Durchschnitt 5500 Laserschüsse verwendet. Um die Spektren automatisiert in die entsprechenden Sequenzen zu übersetzen, wurde eine Spec2Seq-Software in Zusammenarbeit mit TIMM SCHWAAR von der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) programmiert.¹⁶³ Dabei werden in einem ersten Schritt die Fragmentspektren in die Software geladen und die in der Bibliothekssynthese verwendeten Aminosäuren ausgewählt. Ebenfalls können konstante Segmente wie zum Beispiel die Spacersequenz eingefügt werden. Durch das Starten der Analyse werden die intensivsten Fragmentensignale in den Spektren automatisch von der Software detektiert. In einem ersten Schritt werden die Präkursorionen mit den theoretisch möglichen Massen der von der Software generierten Peptidbibliothek verglichen, womit die Anzahl der theoretisch möglichen Sequenzen stark eingeschränkt wird. Das verwendete Massenfenster beträgt dabei $m/z = \pm 0.5$, um Messungenauigkeiten im MALDI auszugleichen. In einem zweiten Schritt errechnet die Software die Fragmente aller möglichen Aminosäurekombinationen und vergleicht diese mit den gemessenen Spektren. Dabei wird jedem erfolgreich identifizierten Fragment eine Punktzahl zugewiesen, um die Übereinstimmungen zu gewichten und die wahrscheinlichste Sequenz auszugeben. Für die Ergebnisse der MALDI-Messungen siehe Kapitel 6.1.

5.9 Synthese der Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate

Die Synthese der Peptide/Peptid-Polymer-Konjugate erfolgte mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese an einem *ABI 433a* Peptidsynthesizer (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Befolgung des Standard *ABI-Fastmoc*-Protokolls (Einfachkupplung) in einem 0.1 mmol Ansatz. Als Festphase für die Peptidsynthese wurde ein Rink-Amid-Aminomethyl-Harz mit einer Beladung von 0.79/0.59 mmol/g verwendet. Für die Peptid-Polymer-Konjugate wurden TentaGel PAP-Harze (*Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, GER) genutzt. Diese sind mit α -Hydroxy- ϵ -amino-funktionalisiertem PEG (1-5 kDa) vorbeladen, welches mit einem säurelabilen Benzyletherlinker mit der Festphase verbunden ist. Der schrittweise Aufbau der Peptidsequenzen nach HBTU/NMP/Piperidin Protokoll (Tabelle 8) konnte mittels UV/Vis-Detektor (Series 200, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) durch Detektion der 9-Dibenzofulven-Piperidin-Addukte quantifiziert werden.

Tabelle 8. Kupplungsprotokoll für die Peptidsynthese am *ABI 433a* Peptidsynthesizer. AA = Aminosäure.

Modul	Reagenzien	Zeit
Fmoc-Entschützung	1 mL 20 % Piperidin in NMP	2 × 1.5 min
Waschen	2.5 mL NMP	4 × 0.6 min
Lösen und Aktivierung AS	1 mmol Fmoc-AA-OH 0.9 mmol 0.45 M HBTU in NMP 1 mL 2 M DIPEA in NMP	9.7 min
Kupplung	s.o.	45 min

Zur Entschützung und Abspaltung der finalen Peptide/Peptid-Polymer-Konjugate von der Festphase wurden die Harze mit einer Mischung aus 95 % TFA, 4 % TES und 1 % Reinstwasser für 3 h bei Raumtemperatur behandelt. Die Abspatlösungen wurden in kaltem Diethylether ausgefällt und die Mischungen zentrifugiert (15 min, 9000 rpm). Die Überstände wurde abdekantiert, der Niederschlag getrocknet und in TFA aufgelöst. Nach erneuter Ausfällung in Diethylether und Trocknung wurden die Peptid-Polymer-Konjugate in Reinstwasser gelöst und mittels FPLC HiTrap Entsalzungssäulen (*Äkta*, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) aufgereinigt. Die Peptid/Polymer-Konjugate wurden gefriergetrocknet und als Pulver erhalten.

Alanin-Scans wurde automatisiert am Multisynthesizer *MultiPep RS* (*Intavis Bioanalytical Instruments AG*, 50933 Köln, GER) hergestellt, welcher bis zu 72 Parallelsynthesen ermöglicht. Die Synthesen wurden im 25 µmol Maßstab in 6 mL Spritzenreaktoren durchgeführt. Da im Gegensatz zur Synthese am *ABI 433a* keine Kupplungskontrolle durch 9-Dibenzofulven-Piperidin-Addukt-Detektion möglich war, wurde der Erfolg der Synthesen durch die manuelle Entfernung der finalen Fmoc-Schutzgruppe und anschließendem Messen mit UV/Vis-Spektroskopie überprüft. Die Aufarbeitung der Synthesen erfolgte wie zuvor beschrieben.

Für die Synthese der *Pal-Pep-PEG* wurden zuerst die entsprechenden Pep-PEG-Konjugate am Synthesizer hergestellt und anschließend manuell Palmitinsäure an die freien *N*-Ter-

mini gekuppelt. Dies erfolgte nach dem Standard-Protokoll mit 2×10 Äquivalenten Palmitinsäure in einer Doppelkupplung für 2 h/über Nacht. Die Abspaltung und Aufreinigung erfolgte wie bereits beschrieben.

Für die veränderten PEG-Längen (**Pep₃-PEG₈₅₀** und **Pep₃-PEG₅₀₀₀**) wurden TentaGel PAP-Harze mit vorbeladenem PEG mit Molekularmassen von 850 g/mol und 5000 g/mol verwendet. Die Synthese am Synthesizer und die anschließende Aufreinigung erfolgte wie bereits beschrieben.

Für die Synthese von **(Pep₃)₂-PEG** wurde in einem ersten Schritt am Synthesizer Fmoc-Lys(Fmoc)-OH an die TentaGel PAP-Festphase gekuppelt. Nach der Fmoc-Abspaltung standen für die weitere Synthese zwei Amin-Funktionalitäten pro Lysineinheit für die Kupplung bereit. Um eine quantitative Umsetzung zu gewährleisten wurde daher nur 0.05 mmol Harz verwendet. Die weitere Synthese lief analog zu den bereits beschriebenen Konjugaten.

5.10 Vorschriften zur Charakterisierung der Peptid-PEG-Konjugate

Die Peptid-PEG-Konjugate wurden mittels Bruker Autoflex III Smartbeam™ MALDI-ToF-MS ohne weitere Fragmentierung charakterisiert. Als Matrix wurde DHB verwendet. ¹H-NMR Spektren wurden mit einem Bruker AV 500 Spektrometer bei 500 MHz in TFA-d₁ bei Raumtemperatur aufgenommen. Analytische UPLC-MS-Messungen wurden mit einem ACQUITY-UPLC® H-Class CM Core System von Waters GmbH (Eschborn, Germany) durchgeführt. Dieses Gerät ist mit einem ACQUITY-UPLC® Photodioden Array (PDA) Detektor (190-800 nm) und einem ACQUITY-UPLC® QDa Massendetektor (positiver Modus) ausgestattet. Die Produktreinheiten wurden mit einer ACQUITY-UPLC® BEH C18 Säule (110 Å, 1.7 µm, 50 × 2.1 mm ID und 100 × 2.1 mm ID, Waters) mit einem linearen Gradienten von 10 % B bis 90 % B innerhalb von 4.5 min mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 mL/min bei 40 °C bestimmt (A = Reinstwasser + 0.1 % HCOOH und B = ACN + 0.1 % HCOOH). Für die Charakterisierung der einzelnen Konjugate siehe Kapitel 6.2.

5.11 Solubilisierung der Wirkstoffe

Zur Überprüfung der Beladungskapazitäten der Peptid-Polymer-Konjugate wurden Wirkstofflösungen mit 1 mg/mL ($c_{\text{BB17}} = 2.07 \mu\text{mol/mL}$ in DMSO) hergestellt. Lösungen der Peptid-Polymer-Konjugate in Reinstwasser wurden mit gleicher Stoffmengenkonzentration hergestellt und in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) zu den Wirkstofflösungen hinzugegeben. Die Mischungen wurden bei Raumtemperatur für 1 h geschüttelt und über Nacht gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden zur Resolubilisierung der Aggregate mit Reinstwasser versetzt (1 mL/1 mg BB17) und für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min, 10 000 rpm) und die wässrige Phase vom nicht-solubilisierten Wirkstoffanteil getrennt. Die Wirkstoffkonzentrationen der gelösten Proben wurden durch UV/Vis-Messungen bestimmt. Dazu wurden 10 μL der Proben mit 990 μL DMSO verdünnt, um die Aggregate aufzubrechen und die spezifischen Absorptionen bei 472 nm (BB17) gemessen. Die Werte wurden mit einer vorher bestimmten Kalibration verglichen und die Konzentrationen berechnet (Abbildung 49).

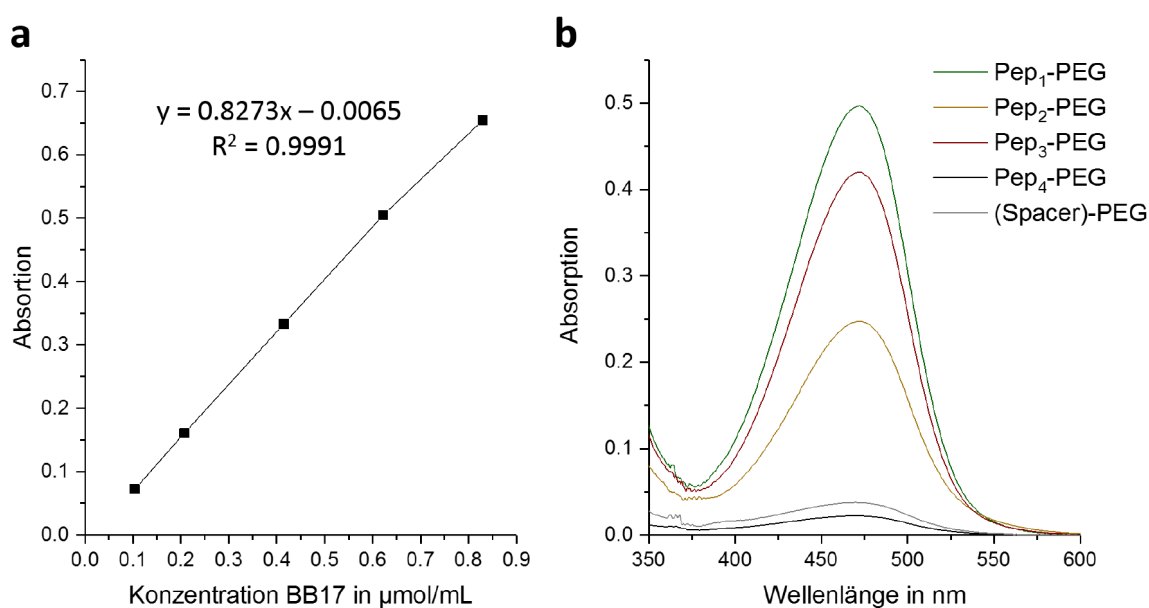


Abbildung 49. Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Beladungskapazitäten bei einer Wellenlänge von 472 nm (a) und UV/Vis Absorptionsspektren verschiedener mit BB17 beladener Peptid-PEG-Konjugate bei einer Verdünnung von 25:1000 in DMSO (b).

5.12 Untersuchung der Wirkstofffreisetzungen

Die Wirkstofffreisetzungseigenschaften wurden über die Fluoreszenzanisotropie und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestimmt. Für die Fluoreszenzanisotropie wurde ein in sich geschlossenes, voll automatisiertes Spektrofluorometer FluoroMax-3® (Jobin Horiba Yvon, Bensheim, GER) genutzt. Dieses ist mit einer Osram XBO 150 Watt Xenon Lampe mit kurzem Lichtbogen und einem R928 Detektor ausgestattet. Eine zusätzliche Heiz-/Kühleinheit ermöglicht eine präzise Temperaturkontrolle bei 25 °C während der Experimente. Als Anregungswellenlänge wurden 472 ± 20 nm und als Detektionswellenlänge 662 ± 20 nm gewählt. Die Datenaufnahme erfolgte alle 15 s mit 1 s Integrationszeit. Die Proben wurden auf eine Konzentration von $c_{\text{BB17}} = 0.1 \mu\text{mol/mL}$ verdünnt und 280 μL in eine Küvette überführt. Die Probe wurde ca. 5 min gemessen bis Signalstabilität erreicht wurde. 1 Äquivalent BSA (20 μL , 100 mg/mL in Reinstwasser) wurde hinzugefügt, gemischt und für 4 h gemessen. Reines BB17 in DMSO, mit BB17 beladenes Kolliphor EL und mit BB17 beladenes BSA wurden als Kontrolle gemessen. Hierbei zeigte reines BB17 in DMSO aufgrund seiner Größe eine geringe Fluoreszenzanisotropie von ca. $A = 0.05$, was einem kleinen, schnell rotierenden Molekül in flüssiger Phase entspricht

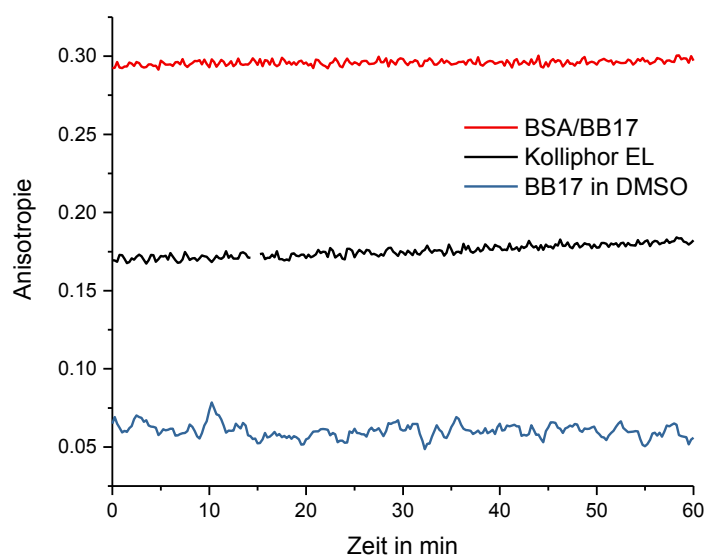


Abbildung 50. Fluoreszenzanisotropiemessungen von BSA/BB17, beladenem Kolliphor EL und reinem BB17 in DMSO. Beladenes Kolliphor EL wurden auf eine BB17 Konzentration von $0.1 \mu\text{mol/mL}$ verdünnt und anschließend mit einem Äquivalent BSA versetzt. Fluoreszenzanregung erfolgte bei 472 ± 20 nm und Detektion bei 662 ± 20 nm.

(Abbildung 50). Die Viskosität von DMSO mit $\eta = 1.99$ cP bei 25 °C ist hingegen deutlich höher als die Viskosität von Wasser mit $\eta = 0.891$ cP bei 25 °C, was zu einer leicht erhöhten Rotationshinderung führt. BSA/BB17 zeigte wie erwartet den höchsten Anisotropiewert von $A \approx 0.3$. Beladenes Kolliphor wurde zuerst ohne BSA-Zugabe gemessen (0-15 min) und weitere 45 min nach Zugabe von BSA. Dabei wurde keine Veränderung der Anisotropie beobachtet.

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemessungen wurden in Kooperation mit CLAUDIA DONTZ der Universität Bayreuth, Arbeitskreis Prof. WEISS, an einem Confocor2 Mikroskop von Zeiss (*Carl Zeiss, Jena, GER*) durchgeführt. Das Mikroskop ist mit einem 40x-Wasserimmersionsobjektiv mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgestattet. Die Detektion fand durch den Einsatz eines Langpassfilters LP560 bei einer Wellenlänge von >560 nm statt. Die Probe befand sich in einem Probenhalter, der durch zwei Deckgläser begrenzt ist. Vor jeder Messung wurde das Gerät durch Messung von dem Oregon Green 488 Farbstoff verifiziert. Bevor Wirkstofffreisetzungstests durchgeführt werden konnten, wurden die durchschnittlichen Diffusionszeiten der Einzelproben bestimmt. 60-65 μL der verdünnten Proben wurden in die Probenkammer gefüllt und mehrere Zeitspuren aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte durch eine bereits etablierte Fit-Funktion für normale Einkomponenten-Diffusion (Gleichung 2).

$$C(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{1 - \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{\tau}{S^2 \tau_D}}} + C(\infty)$$

Gleichung 2. Fit-Funktion für Einkomponenten-Diffusion.

$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$ beschreibt dabei die durchschnittliche Verweildauer eines fluoreszenten Partikels im konfokalen Volumen. Der konfokale Radius ist durch r_0 und die Diffusionskonstante der Fluorophore durch D gegeben. Die Ausdehnung des konfokalen Radius entlang der optischen Achse wurde durch den Parameter $S = 5$ beschrieben und wurde während der Auswertung konstant gehalten. Der Vorfaktor $1/N$ beinhaltet die durchschnittliche Anzahl an fluoreszenten Partikeln im konfokalen Volumen und kann zusätzliche Eigenschaften von nicht-gequenchten Fluorophoren enthalten. Die Datenauswertung

wurde auf Diffusionszeiten von $\tau > 1\mu\text{s}$ eingestellt. Da der Einfluss weiterer photophysikalischer Effekte wie z. B. Tripletzustände vernachlässigbar ist, wurden diese nicht in die Berechnungen einbezogen, um die Anzahl freier Parameter zu beschränken. Für die Wirkstofffreisetzungstests wurden die Proben ($10\mu\text{M}$ bezogen auf BB17) mit einem Äquivalent BSA gemischt, kurz geschüttelt und ins Mikroskop transferiert, wobei das Mischen der zwei Lösungen den Start der Reaktion bestimmt. Daten wurden bei Raumtemperatur alle 2 min aufgenommen, mit 1 min Messzeit und 1 min Pause. Die Messungen wurden nach 120 min gestoppt, da nur noch geringfügige Änderungen beobachtet wurden. Jede Probe wurde 7-8 mal vermessen und die Daten mit einem Zweikomponenten-Fit-Modell ausgewertet (Gleichung 3):

$$C(\tau) = \frac{f}{N} \frac{1}{1 - \frac{\tau}{\tau_{D1}}} \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{\tau}{s^2 \tau_{D1}}}} + \frac{1-f}{N} \frac{1}{1 - \frac{\tau}{\tau_{D2}}} \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{\tau}{s^2 \tau_{D2}}}} + C(\infty).$$

Gleichung 3. Fit-Funktion für Zweikomponenten-Diffusion.

Die Fraktion der aggregatgebundenen Fluorophore wird hierbei durch f und die Fraktion der BSA-gebundenen Fluorophore durch $1-f$ beschrieben. τ_{D1} und τ_{D2} sind dabei die Diffusionszeiten der beladenen Transportern und des beladenen BSA in Wasser. Um die Anzahl an freien Parametern beim Fitten zu begrenzen, wurde τ_{D2} während des der Berechnung konstant gehalten. Dies setzt das Ausbleiben der Agglomeration von mit BB17 beladenem Transporter voraus, was in initialen Messungen auch bestätigt wurde.

5.13 Größenbestimmung der Aggregate mittels DLS und Kryo-TEM

Zur Bestimmung der Größe der Aggregate wurden dynamische Lichtstreuung (DLS) und Kryo-TEM verwendet. Für DLS-Messungen wurde ein Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments Ltd.*, Worcestershire, UK) mit einem He-Ne-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 632.8\text{ nm}$ genutzt. Die BB17-beladenen/-freien Proben wurden in Reinstwasser auf eine Konzentration von 0.37 mmol/L verdünnt und erneut zentrifugiert, um Staubpartikel

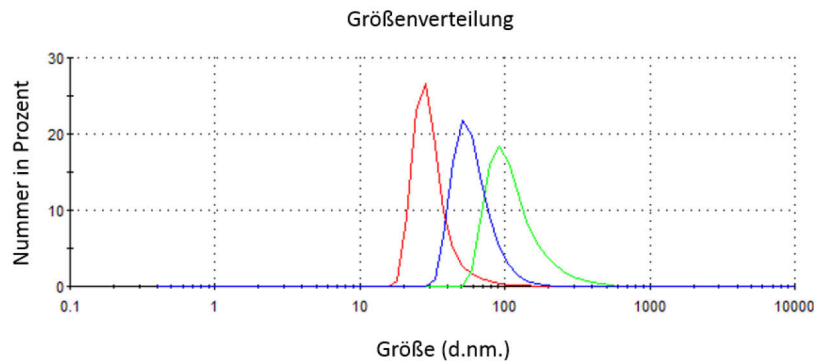


Abbildung 51. DLS Messungen von beladenem Pep₁-PEG (grün), Pep₂-PEG (blau) und Pep₃-PEG (rot). Die Messungen wurden in Reinstwasser bei 25 °C mit einer Konjugat-Konzentration von $c = 0.37$ mmol/L durchgeführt.

oder andere Verunreinigungen zu entfernen. Die Lösungen (0.5 mL) wurden in Einmal-küvetten aus Polystyrol überführt und bei 25 °C im Rückstreuungsmodus und einem Streuwinkel von 90° gemessen. Die Auswertung erfolgte direkt im Anschluss automatisiert mit der Zetasizer-Software, bei der die zeitabhängige Messung korreliert und gefittet wurde (Abbildung 51).

Für die Größenbestimmung der Aggregate mittels Kryo-TEM wurden 4 µL der Suspension (1 mg/mL Konjugat) auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfer-TEM Gitter (*Quantifoil Micro Tools GmbH*, Jena, GER) gebracht und durch Tauchen in ein flüssiges Ethanbad unter Benutzung eines Vitrobot Mark IV (FEI, Eindhoven, Niederlande) bei 4 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit gefroren. Die Gitter wurden auf einem Kryo-Transfer Halter befestigt und im JEOL JEM-2100 (*JEOL GmbH*, Eching, GER) Transmissionselektronenmikroskop platziert. Das Mikroskop wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrieben und

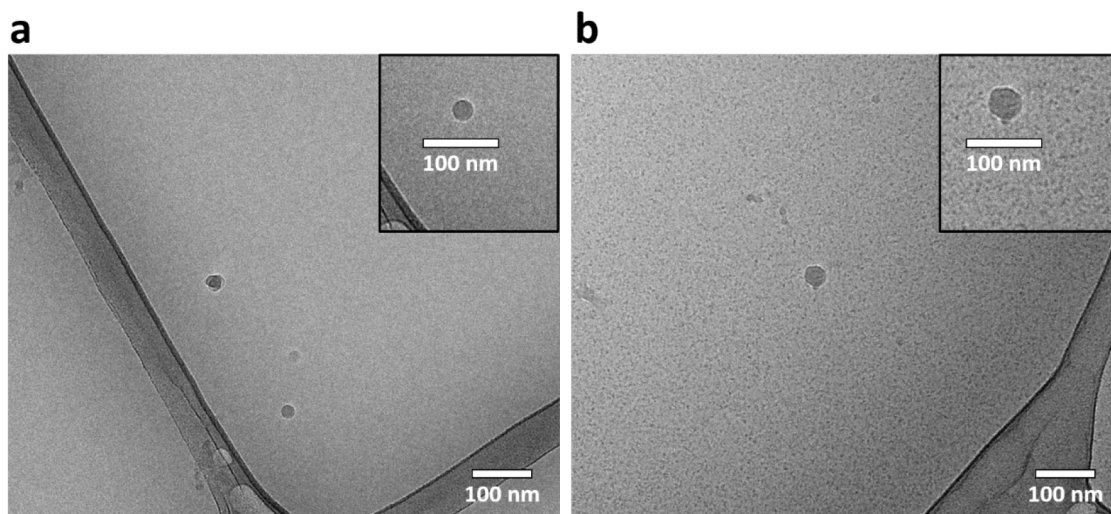


Abbildung 52. Kryo-TEM Bilder von beladenem Pep₃-PEG (links) und nach Zugabe von BSA (rechts).

mikroskopische Aufnahmen wurden digital mit einer am Boden des Geräts montierten 4*4k CMOS Kamera (TemCam-F416, *TVIPS*, Gauting, GER), mit einer Vergrößerung von 50000 \times aufgenommen, was einer Pixelgröße von 2.32 Å auf Probenlevel entspricht (Abbildung 52).

Für beladenes **Pep₃-PEG** wurden Größen von $D \approx 25$ nm und nach Zugabe von BSA von $D \approx 40$ nm bestimmt.

5.14 Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration

Zur Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentrationen (*cac*) wurde ein Tensiometer (Tensiometer K12, *Fa. Krüss GmbH*, Hamburg, GER) genutzt. Die Messungen wurden in Kooperation mit IRINA SHEKOVA vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung nach der Ring-Methode (Platin-Iridium Ring mit einem Radius von 9.545 mm) durchgeführt (Tabelle 9, Abbildung 53).

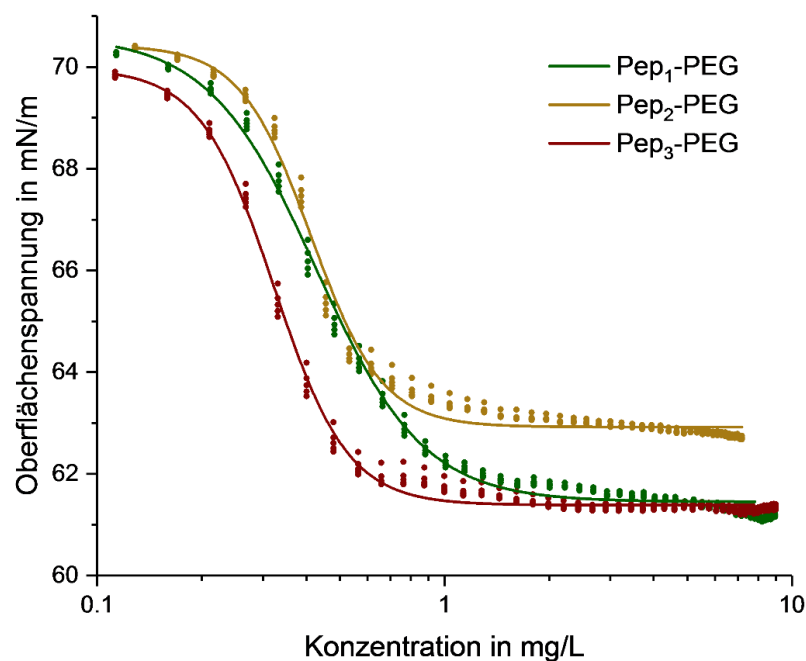


Abbildung 53. Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentrationen von Pep₁₋₃-PEG mittels Tensiometrie nach der Ring-Methode durch Titration der Konjugate in Reinstwasser.

Tabelle 9. Ergebnisse der *cac*-Messungen.

Sequenz	<i>cac</i> in mg/L	<i>cac</i> in mol/L
Pep₁-PEG	0.786	2.1×10^{-7}
Pep₂-PEG	0.581	1.5×10^{-7}
Pep₃-PEG	0.541	1.4×10^{-7}

5.15 *In vitro* Tests und Zelltests

Sowohl die beladenen, als auch freien Peptid-Polymer-Konjugate wurden in Kooperation mit MARKUS PICKHARDT vom Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in *in vitro* Experimenten auf die Fähigkeit zur Inhibierung der Tau-Aggregation getestet. Dazu wurde ein Thioflavin S Fluoreszenzassay durchgeführt. Tau^{3RD} (K19, 10 µM, MW 10567 g/mol) in 50 mM NH₄Ac wurde mit Heparin₃₀₀₀ (2.5 µM) und den Peptid-Polymer-Konjugaten (Konzentrationen von 200 pM - 60 µM) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.^{187,219-220} Anschließend wurde Thioflavin S (20 µM) hinzugegeben, und die spezifische Fluoreszenz mit einer Anregung bei 440 nm bei einer Emission von 521 nm gemessen. Ebenfalls wurde reines BB17 untersucht, welches einen IC₅₀ von 0.5 µM zeigte.

In den Zelltests wurden Tau^{4RDAK} exprimierende N2a-Zellen für vier Tage mit den beladenen Konjugaten inkubiert. Aufgrund von Autofluoreszenzen konnte jedoch keine ThS-Fluoreszenz genutzt werden. Daher wurden die Zellen lysiert (für weitere SDS-PA Gelelektrophoresen und Western Blot) und die gesamte Tau^{4RDAK} Konzentration mittels pan-Tau Antikörper K9JA bestimmt.³ Zusätzlich sollten die löslichen und unlöslichen Anteile des Tau^{4RDAK} über ein Pelletierassay bestimmt werden. Hierzu wurden die Zelllysate bei 135000×g für eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert und mittels Western Blot (150 mA, 1.5 h mit pan-Tau Antikörper K9JA) und SDS-Page (17 %, 100 V, 2 h bei Raumtemperatur) analysiert. Anschließend wurden die Proteinmengen pro Probe auf ein Lysat von 50.000 Zellen normiert.

5.16 Synthese der Polymere für fragmentierungsfreie Sequenzierung

Die Synthese der Polymere erfolgte in Kooperation mit CHLOÉ LAURE und GIANNI CAVALLO vom Institut Charles Sadron. Als Festphase für die Synthese des Polyalkoxyaminamids **PP1** (GKKGG11100, von C- zu N-Terminus) wurde ein Fmoc-Gly-Wang-Harz mit einer Beladung von 0.84 mmol/g verwendet (0.1 mmol, 119 mg) und mittels manuellem Standard-Fmoc-Protokoll die Spacersequenz Gly-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc) schrittweise gekuppelt. Zur Vermeidung von ungewollten Abbruchsequenzen oder freien Amin-Funktionalitäten wurde das Harz nach jedem Kupplungsschritt acetyliert. Nach Entfernung der finalen Fmoc-Schutzgruppe wurde das Polymer beginnend mit 1-Bit schrittweise aufgebaut. Dazu wurde das Harz in einen Glasreaktor mit Fritte überführt, mit 2-Bromoisobuttersäureanhydrid (Vorstufe 1-Bit, 5 Äq., 0.5 mmol) und K_2CO_3 (18 Äq., 1.8 mmol) in THF versetzt und für 50 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde verworfen und das Harz mit MeOH/H₂O (1:1, v/v) und THF gewaschen um Rückstände von K_2CO_3 zu entfernen. Für die Kupplung des Radikals wurde 95 % 4-Amino-TEMPO mit einem Zusatz von 5 % TEMPO genutzt, um gezielt Abbruchsequenzen zu erzeugen. Die Nitroverbindungen (insgesamt 6 Äq., 0.6 mmol) wurden mit Me₆TREN (3.3 Äq., 0.33 mmol) in wasserfreiem DMSO gelöst und zu dem Harz gegeben. Der Glasreaktor wurde verschlossen und für 10 min mit Argon begast um Sauerstoff zu entfernen. CuBr (3 Äq., 0.3 mmol) wurde hinzugefügt und für 30 min unter Inertgas geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde verworfen und das Harz mit THF gewaschen. Die nächsten beiden Kupplungen von 1-Bit wurden nach gleicher Vorschrift gekuppelt. Für die Kupplungen von 0-Bit wurde 2-Bromopropionsäureanhydrid (Vorstufe 0-Bit, 5 Äq., 0.5 mmol) verwendet. Die Reaktion wurde analog zur 1-Bit Synthese durchgeführt, jedoch wurde DIPEA als Base genutzt anstatt von K_2CO_3 . Die Abspaltung von der Festphase erfolgte durch Zugabe von TFA:DCM:Reinstwasser (49.5:49.5:1, v/v) für 2 h woraufhin die Mischung gefriergetrocknet wurde. Das Produkt wurde als freie Säure erhalten. Wie in Kapitel 3.5.1 bereits erwähnt wurde die Polymermischung mittels MALDI-MS mit DHB als Matrix vermessen. Dabei konnte das vollständige Polymer GKKGG11100 mit 1526.92

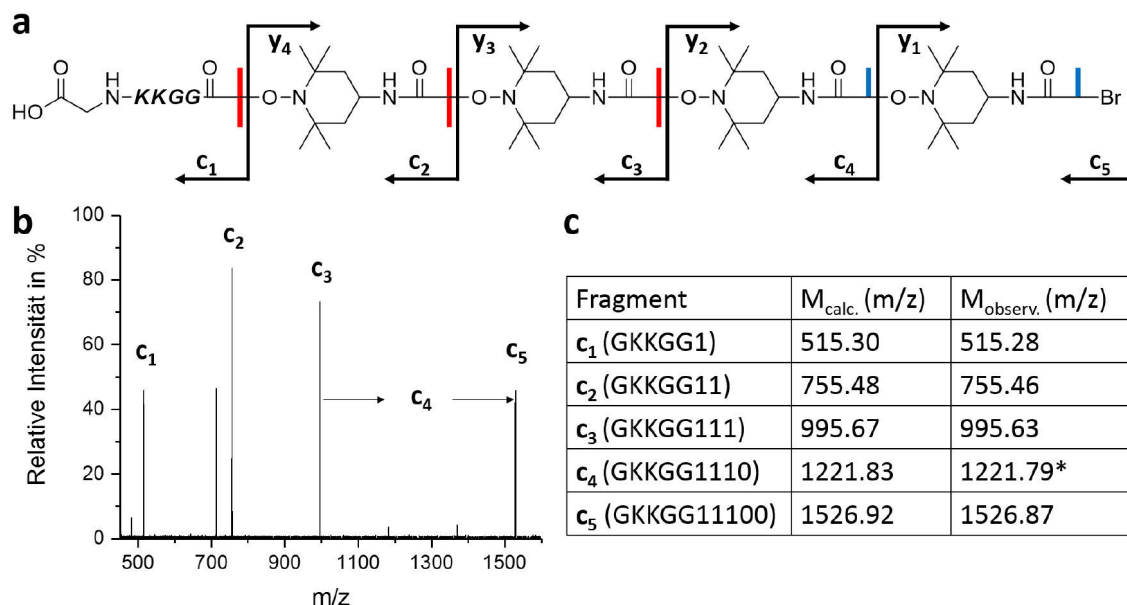


Abbildung 54. (a) Fragmentierungsmechanismus des Präzisionspolymers **PP1**. (b) MALDI-MS/MS-Messungen des vollständigen Polymers. Es werden nur **c**-Fragmente beobachtet, welche jedoch zur vollständigen Identifizierung ausreichen. (c) Erwartete und beobachtete m/z Verhältnisse. Die Abweichungen betragen maximal $m/z = 0.05$. * Das Fragment zeigte nur geringe Intensitäten und kann nur bei starker Vergrößerung des Spektrums erkannt werden.

m/z eindeutig identifiziert werden. Zur Sequenzüberprüfung wurde das vollständige Polymer nun in einer weiteren Messung fragmentiert (Abbildung 54). Nach der von WESDEMIOTIS *et al.* eingeführten Terminologie für synthetische Polymerfragmente werden dabei Fragmente die nach Abspaltung einer C-ON Bindung noch die α -Endgruppe beinhalten als **c**-Fragmente bezeichnet.^{174,221} Die entsprechenden Gegenstücke sind die **y**-Fragmente, die dementsprechend das ω -Ende tragen. Es wurden in der Messung jedoch nur **c**-Fragmente beobachtet, da diese im Vergleich zu den entsprechenden **y**-Fragmenten einfacher positiv geladen werden können. Weiterhin wurde das vollständige Polymer, hier als **c**₅-Fragment bezeichnet, im unfragmentierten Zustand beobachtet. Einzig das Fragment **c**₄ war ohne weitere Vergrößerung des Spektrums nicht identifizierbar. Dies lässt sich auf die Stabilität der geformten Radikale zurückführen, wobei sekundäre Radikale instabiler sind als tertiäre Radikale und somit geringere Intensitäten in Fragmentierungsexperimenten aufweisen. Die Zuordnung der Sequenz war jedoch auch trotz fehlendem Fragment möglich, da der Abstand von **c**₃ zu **c**₅ nur durch zwei 0-Bit Einheiten generiert worden sein kann. Dies könnte jedoch bei länger codierten Polymeren zu Problemen führen, da jedes fehlende Fragment die Zuordnung erschwert. Generell lässt sich aus dieser Eigenschaft

jedoch eine Annahme ableiten: Sollte durch das Fehlen eines Fragments eine Lücke entstehen, die genau der Summe aus 0-Bit und 1-Bit entspricht, so kann angenommen werden, dass das fehlende Fragment der 0-Bit Spezies zuzuordnen ist. Natürlich muss dies durch genauere Untersuchung des Spektrums geprüft werden, jedoch gibt diese Annahme einen ersten Hinweis zur schnellen Sequenzidentifizierung. Die Polymermischung wurde ebenfalls mittels ESI-QDa-MS untersucht (Abbildung 55). Dazu wurde die Probe in ACN:Reinstwasser (1:1, v/v + 0.1 % TFA) gelöst und an der UPLC mit Direkteinspritzung vermessen. Da der QDa-Detektor nur m/z Verhältnisse unter 1250 erfassen kann, war es nicht möglich die Sequenzen GKKGG11100 und GKKGG1110 zu messen. Die Einfachladungen der anderen Sequenzen waren detektierbar, jedoch zeigten diese sehr geringe Intensitäten, weshalb es teilweise zu signifikanten Massenabweichungen kam. Dass die Einfachladungen geringe Intensitäten aufweisen war erwartet, da das Gleichgewicht durch den Einbau von Lysinen und durch die Verwendung von TFA versetzter Lösung

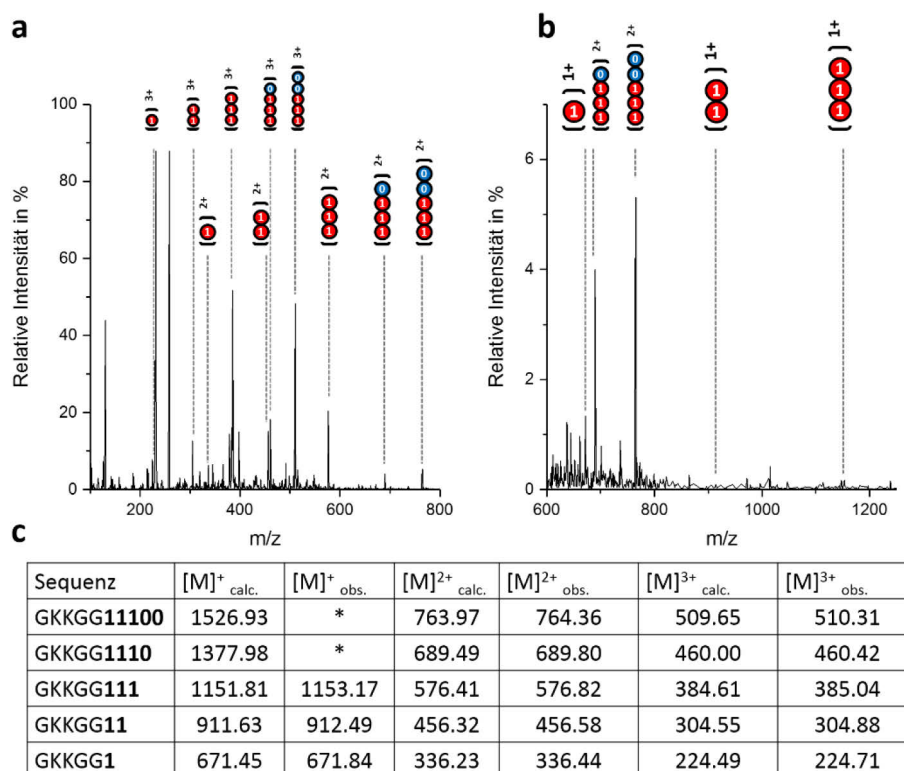


Abbildung 55. ESI-QDa MS-Messung von PP1 mit (a) einem gezeigten Massenbereich von $m/z = 100-800$ und (b) von $m/z = 600-1250$. Die Signalintensitäten der Sequenzen sind im hohen Massenbereich deutlich geringer als im niedrigen, weshalb in Spektrum (b) die y-Achse so angepasst wurde, dass die Peaks gut erkennbar sind. Es wurden Einfach-, Zweifach- und Dreifachladungen identifiziert. Tabelle (c) zeigt die erwarteten und beobachteten m/z Verhältnisse. Besonders im unteren Massenbereich wurden dabei hohe Massengenauigkeiten erreicht. * Diese m/z konnten nicht gefunden werden, da der QDa-Detektor nur $m/z < 1250$ detektiert.

stark auf die Seite der doppelt-protonierten Spezies verschoben ist. Dies zeigte sich durch die intensiven Signale der Zweifachladungen, die gute Massengenauigkeiten aufwiesen. Ebenfalls konnten Dreifachladungen nachgewiesen werden, die sogar deutlich stärkere Intensitäten als die entsprechenden Zweifachladungen zeigten. Eine automatisierte Auswertung der ESI-MS-Spektren konnte durch die Verwendung der Spec2Sq-Software erreicht werden.

Als Festphase für das Phosphoramidit GGGG10100 (von C- zu N-Terminus) wurde ein TentaGel-HL-NH₂-Harz mit einer Beladung von 0.49 mmol/g ausgewählt. In einem ersten Schritt wurde der basenlabile Linker HMBA gekuppelt. Hierzu wurden PyBOP (10 Äq.), HMBA (5 Äq.) und DIPEA (20 Äq.) in NMP gelöst, auf den mit Harz beladenen Spritzenreaktor aufgezogen und für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde anschließend verworfen und eine zweite Kupplung unter gleichen Bedingungen wiederholt. Ein Kaisertest bestätigte die Abwesenheit freier Amine. Die Kupplung des ersten Glycins wurde durch Zugabe von Fmoc-Gly-OH (10 Äq.), DIC (5 Äq.) in trockenem NMP und DMAP (0.1 Äq.) erreicht. Der Spritzenreaktor wurde für 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt und eine zweite Kupplung unter gleichen Bedingungen über Nacht durchgeführt. Das Harz wurde gewaschen und verbliebene Alkoholfunktionalitäten acetyliert. Die weiteren Aminosäurekupplungen folgten dem Standard Fmoc-Protokoll. 6-Hydroxyhexansäure (DMT) (10 Äq.) wurde mit PyBOP (10 Äq.) und DIPEA (20 Äq.) gekuppelt, verbliebene Amin-Funktionalitäten acetyliert und die DMT-Schutzgruppe mit 3 % TFA in DCM für 2 h abgespalten. Für die Polymersynthese wurde das entsprechende Phosphoramidit (3.3 Äq.) in wasserfreiem Acetonitril und Tetrazol (4 Äq., 0.45 M Lösung in Acetonitril) gelöst, unter Argonatmosphäre zum Harz gegeben und für 1 geschüttelt. Das Harz wurde mit Acetonitril gewaschen und der entstandene Phosphitriester mit 0.1 M Iod-Lösung (I₂ in Wasser/2,6-Lutidin/THF, 2/20/80) für 20 min zum entsprechenden Phosphotriester oxidiert. Überschüssiges Iod wurde durch intensives Waschen mit DCM entfernt und das Harz auf wasserfreies DMSO umgequollen. Die Kupplung des Radikals lief analog zur Synthese des Polyalkoxyaminamids, jedoch mit einem 6-Hydroxyhexanamid-

TEMPO Derivat. Die Kupplungsschritte wurden für die Kupplung der weiteren Monomerbausteine wiederholt. Die Abspaltung von der Festphase erfolgte durch Zugabe von wässriger Ammoniaklösung (25 %):Dioxan (4:1, v/v) für 24 h bei Raumtemperatur. Die Abspaltung wurde gefriergetrocknet und das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

5.17 Synthese von Pep₃-PSar

Die Synthese von **Pep₃-PSar** erfolgte in Kooperation mit AFRODITI DORITI vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung. Die Synthese von Poc-Sar (*N*-Phenoxycarbonyl-*N*-sarcosin) erfolgte nach Vorschrift.¹⁸⁵ Für die Polymerisation von Poc-Sar wurde ein Fmoc Rink-Amid-Harz mit Piperidin (20 %, v/v in NMP) entschützt und das Harz mehrfach mit NMP und DCM gewaschen und getrocknet. Das Harz wurde in DMSO vorgequollen und unter Stickstoffatmosphäre Poc-Sar (50 Äq.) und DIPEA (8 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 60 °C erhitzt und 24 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde verworfen und das Harz ausgiebig mit DMSO gewaschen. Zur Kupplung des Peptids wurde die erste Aminosäure (Phe) manuell mit 10 Äq. Aminosäure, 10 Äq. PyBOP und 20 Äq. DIPEA dreifach gekuppelt und anschließend acetyliert. Die weitere Peptidsequenz wurde ebenfalls manuell doppelt gekuppelt. Die Abspaltung erfolgte mit 95 % TFA, 2.5 % TES und 2.5 % Reinstwasser. Das Produkt wurde aufgereinigt und als weißes Pulver erhalten. Für Produktcharakterisierung siehe Kapitel 6.2.

5.18 Bibliotheksscreening gegen MK1

Bib2 wurde in NMP vorgequollen und mit **MK1** (0.1 mg/mL) in Reinstwasser für 24 h inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und das Harz 5 × mit Reinstwasser gewaschen. Das in Reinstwasser suspendierte Harz wurde anschließend mit H₂S behandelt, wodurch sich **MK1** zu schwarzem Bi₂S₃ zersetzte und somit Wirkstoffanreicherungen sichtbar machte. Unter dem Durchlichtmikroskop wurden die Harzkügelchen analysiert, schwarz gefärbte und farblose Harzkügelchen manuell separiert und in Probengefäße überführt. Zur Abspaltung der Peptidsequenzen wurden Harzkügelchen mit 20 µL Reinstwasser versetzt und für 2 h mit UV-Licht bestrahlt. Die Proben wurden zentrifugiert und die Lösung mit MALDI-ToF-MS analysiert (siehe Kapitel 6.1).

Die Synthese von **CBS** und **CNS** erfolgte nach Standard *ABI-Fastmoc* Protokoll und der Einbau des Maleimids (**CBS-Mal** und **CNS-Mal**) über eine Handkupplung mit 3-(2,5-Di-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propansäure (Maleimid-Linker).

Für die LA-ICP-MS-Messungen wurde eine 2 mM Lösung von **CBS-Mal/CNS-Mal** in Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5) 2 h auf einer thiolbeschichteten Oberfläche inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte in einem zweiten Schritt die 15-minütige Inkubation einer 0.1 mM Lösung des Clusters **MK1** in Reinstwasser. Nach intensivem Waschen und Behandlung im Ultraschallbad wurden die Glasobjektträger an der Luft getrocknet. Für die anschließenden LA-ICP-MS-Messungen wurde das Isotop ^{209}Bi ausgewählt. Für die Ablation einzelner Linien wurden eine Spotgröße von 250 μm Durchmesser, eine Scangeschwindigkeit von 250 $\mu\text{m/s}$ und eine Frequenz von 20 Hz gewählt. Bei jeder Probe wurden drei Linien mit dem Laser abgetragen. Die jeweilige Intensitätsverstärkung wurde in Relation zur Blindprobe berechnet (unbehandelte, thiolbeschichtete Glasoberfläche).

6 Anhang

6.1 Ergebnisse der Bibliotheksscreenings

Screening von BB17 gegen die nicht-immobilisierte Bib1

Tabelle 10. Als Binder identifizierte Sequenzen. Die zusätzliche C-terminale Sequenz FFQKQQG wurde der Übersicht halber nicht mit angegeben.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	K	F	F	E	L	E	L	183
2	F	F	L	K	F	F	N	176
3	K	G	F	G	F	L	G	169
4	F	G	G	E	L	N	L	158
5	K	N	N	E	F	S	F	153
6	K	S	E	F	S	L	F	152
7	K	K	G	L	L	E	L	152
8	K	N	N	E	S	L	F	151
9	N	G	E	F	E	G	F	151
10	F	F	S	E	E	N	L	149
11	L	S	F	E	F	E	N	148
12	L	G	L	S	L	L	E	145
13	K	N	S	G	F	L	L	143
14	F	S	F	G	E	F	G	136
15	L	F	G	L	L	N	E	133

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 11. Identifizierte Sequenzen mit geringer Affinität zu BB17. Die zusätzliche C-terminale Sequenz FFQKQQG wurde der Übersicht halber nicht mit angegeben.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	K	K	K	S	G	K	L	170
2	F	F	N	L	K	N	L	167
3	K	G	L	S	G	F	F	150
4	F	L	L	G	L	L	N	147
5	L	G	E	E	E	G	F	147
6	F	N	S	F	S	G	E	145
7	E	S	S	E	F	F	L	144
8	L	N	F	N	F	S	N	141
9	N	F	S	N	F	F	K	137
10	F	N	S	E	S	E	L	135
11	N	G	L	E	G	F	F	134
12	E	S	F	E	F	S	E	134
13	F	S	E	E	N	L	L	133
14	N	E	L	N	L	L	G	132
15	N	G	S	N	F	S	F	130

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Screening von BB17 gegen Bib2

Tabelle 12. Als **Keeper** identifizierte Sequenzen.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	N	S	L	L	F	F	F	90
2	F	N	N	F	G	F	F	90
3	S	F	F	F	F	N	N	92
4	S	F	F	N	L	F	F	92
5	S	F	F	L	L	F	L	98
6	L	L	G	F	F	L	F	100
7	K	L	F	L	L	L	S	96

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 13. Als **medium Releaser** identifizierte Sequenzen.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	S	N	E	K	N	F	F	92
2	F	F	L	L	F	F	E	104
3	F	E	S	F	F	K	N	100
4	L	L	G	E	F	F	G	136
5	S	F	F	L	F	S	E	90
6	S	N	F	E	S	F	F	112
7	S	N	N	F	F	E	F	104

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 14. Als **Releaser** identifizierte Sequenzen.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	E	F	F	E	F	F	F	104
2	E	F	L	K	S	F	E	98
3	K	E	N	F	G	K	S	120
4	F	N	K	E	F	L	F	92
5	S	G	F	E	F	E	F	116
6	E	L	K	F	L	L	F	126
7	F	N	E	L	F	F	E	90

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 15. Als nicht-Binder identifizierte Sequenzen.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	K	N	L	K	K	N	G	176
2	S	N	G	S	G	F	S	164
3	E	S	F	G	S	K	L	158
4	E	K	N	K	G	L	G	156
5	E	G	S	K	E	G	G	156
6	S	E	K	S	N	L	K	154
7	E	G	G	E	S	F	L	152
8	E	K	S	S	S	S	L	152
9	K	G	G	L	S	K	L	152
10	S	S	G	G	E	S	F	152
11	G	E	G	G	L	L	N	152
12	S	S	N	N	N	F	F	150
13	E	N	G	E	N	S	N	148
14	E	G	N	S	L	S	L	148
15	E	G	N	E	G	F	K	146
16	E	F	G	F	E	L	G	146
17	E	G	G	E	E	E	N	144
18	K	G	L	S	L	N	G	140
19	S	G	N	N	E	E	E	134
20	K	N	L	S	N	E	L	132
21	E	L	G	G	E	K	N	132
22	E	S	S	S	F	E	L	130
23	E	N	G	S	G	K	F	130
24	E	K	N	L	G	F	G	130
25	K	S	F	S	F	N	S	130
26	S	N	G	S	F	F	E	126
27	E	G	N	G	N	E	L	120
28	F	G	G	L	L	F	N	120
29	E	S	K	N	S	G	K	114
30	K	N	L	K	N	L	F	110
31	E	N	N	K	L	L	F	110
32	E	S	K	E	E	F	E	108
33	S	F	E	E	E	S	E	108
34	E	N	F	K	K	F	K	100
35	N	N	N	L	L	N	F	100
36	E	F	E	L	N	F	L	98
37	E	S	L	L	F	N	E	98
38	E	N	S	K	L	F	L	96
39	N	S	F	F	K	G	N	96
40	K	S	G	S	F	L	L	92

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Screening von BB17 gegen Bib3

Tabelle 16. Als **Keeper** identifizierte Sequenzen. Maximale Anzahl an Fragmenten = 8.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Frag.
1	E	F	F	F	F	F	S	6
2	S	N	L	F	L	F	F	8
3	F	F	L	E	F	F	F	7
4	E	L	G	F	F	L	F	8
5	F	L	L	F	S	F	F	8
6	S	F	F	F	G	F	L	7
7	N	G	F	F	F	L	F	8
8	S	N	L	L	L	F	F	8
9	G	L	F	F	G	F	F	8
10	N	L	L	F	F	L	L	8
11	L	L	L	L	E	F	L	7
12	F	F	S	F	G	F	F	8

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 17. Als **medium Releaser** identifizierte Sequenzen. Maximale Anzahl an Fragmenten = 8.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Frag.
1	F	L	F	F	L	S	E	6
2	F	F	L	F	E	F	L	7
3	F	F	G	L	L	L	F	8
4	S	L	L	G	F	F	F	7
5	E	F	F	F	G	F	F	8
6	G	F	F	F	G	F	L	7
7	S	L	F	F	G	F	S	7
8	F	L	L	L	F	F	L	8
9	S	F	G	L	F	F	L	8
10	N	L	F	F	L	E	S	7
11	E	F	N	L	F	F	F	8
12	F	L	E	F	L	F	F	7
13	F	L	F	G	F	G	L	7
14	S	S	L	L	L	F	L	8
15	F	L	N	F	E	F	F	7
16	F	S	F	L	L	L	E	6
17	L	N	L	L	F	F	L	8
18	F	L	L	F	F	G	S	8
19	F	G	F	L	F	E	F	8
20	G	L	F	S	F	F	F	8
21	L	L	S	F	F	E	F	7
22	F	S	L	N	F	F	F	8
23	F	F	L	F	E	L	G	7

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 18. Als **Releaser** identifizierte Sequenzen. Maximale Anzahl an Fragmenten = 8.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Frag.
1	F	E	E	F	N	F	F	7
2	S	F	F	L	E	F	F	7
3	S	L	F	F	L	E	F	7
4	F	G	G	N	E	F	E	5
5	N	F	F	F	E	F	E	7
6	L	E	K	N	E	G	L	7
7	G	L	F	L	E	S	F	6
8	F	E	F	F	E	F	F	7

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Screening von MK1 gegen Bib2

Tabelle 19. Binder für MK1

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion score
1	E	S	E	K	G	N	K	188
2	E	S	K	E	G	L	E	188
3	E	N	G	N	E	F	E	174
4	E	E	S	K	G	F	E	168
5	G	E	G	G	S	N	E	162
6	E	L	L	S	G	F	F	156
7	K	S	L	L	E	L	E	152
8	E	G	G	L	N	K	E	150
9	E	G	G	F	N	E	S	150
10	E	L	E	E	E	S	G	148
11	E	N	E	G	K	K	S	148
12	E	S	K	G	K	L	E	148
13	E	N	G	K	E	S	L	146
14	E	S	G	L	S	K	E	142
15	E	G	G	E	G	F	L	142
16	E	N	L	G	N	L	E	140
17	E	G	G	K	F	E	E	140
18	E	L	G	L	E	S	E	138
19	E	N	L	S	L	E	E	136
20	E	K	E	N	G	L	G	134
21	G	K	G	G	E	S	E	132
22	E	E	N	G	K	G	L	130
23	E	G	G	E	F	E	K	130
24	E	G	G	E	E	F	K	128
25	K	S	G	E	N	L	L	128
26	E	S	S	K	E	E	K	128
27	E	E	G	G	K	L	K	126
28	E	G	G	G	L	L	K	126
29	E	N	G	G	F	K	G	124
30	K	G	G	E	G	E	S	122

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

Tabelle 20. Nicht-Binder für MK1.

	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Ion Score
1	K	E	K	F	G	L	F	170
2	K	N	F	G	N	K	N	160
3	K	S	K	N	K	K	F	158
4	E	N	K	S	L	L	G	158
5	E	K	S	G	K	K	L	156
6	S	L	G	N	L	N	F	152
7	K	S	L	K	L	S	N	150
8	K	S	F	N	L	L	L	150
9	K	S	N	L	F	L	N	146
10	K	N	K	S	N	N	F	144
11	E	G	G	F	K	K	N	140
12	K	S	S	N	L	S	L	136
13	K	S	F	N	N	K	L	136
14	E	S	L	K	S	L	K	136
15	K	S	S	G	L	S	K	134
16	G	N	N	N	L	S	L	130
17	K	N	S	K	L	L	K	130
18	K	N	G	G	L	L	N	126
19	K	S	F	G	L	L	E	126
20	E	S	G	G	K	L	L	118
21	E	G	F	S	K	L	S	116
22	S	G	L	S	L	G	F	116
23	K	S	K	G	K	S	K	110
24	K	F	G	G	L	K	F	106
25	K	N	K	F	F	F	L	98
26	K	L	F	N	N	K	F	94
27	K	L	K	L	K	K	G	90
28	S	L	L	N	F	N	L	90
29	E	G	N	K	F	G	L	86
30	K	F	S	G	F	K	F	80

Farbcode: Blau = basisch, leicht blau = hydrophob, rot = sauer, leicht rot = polar, grau = keine Funktionalität.

6.2 Produktcharakterisierungen

BB17

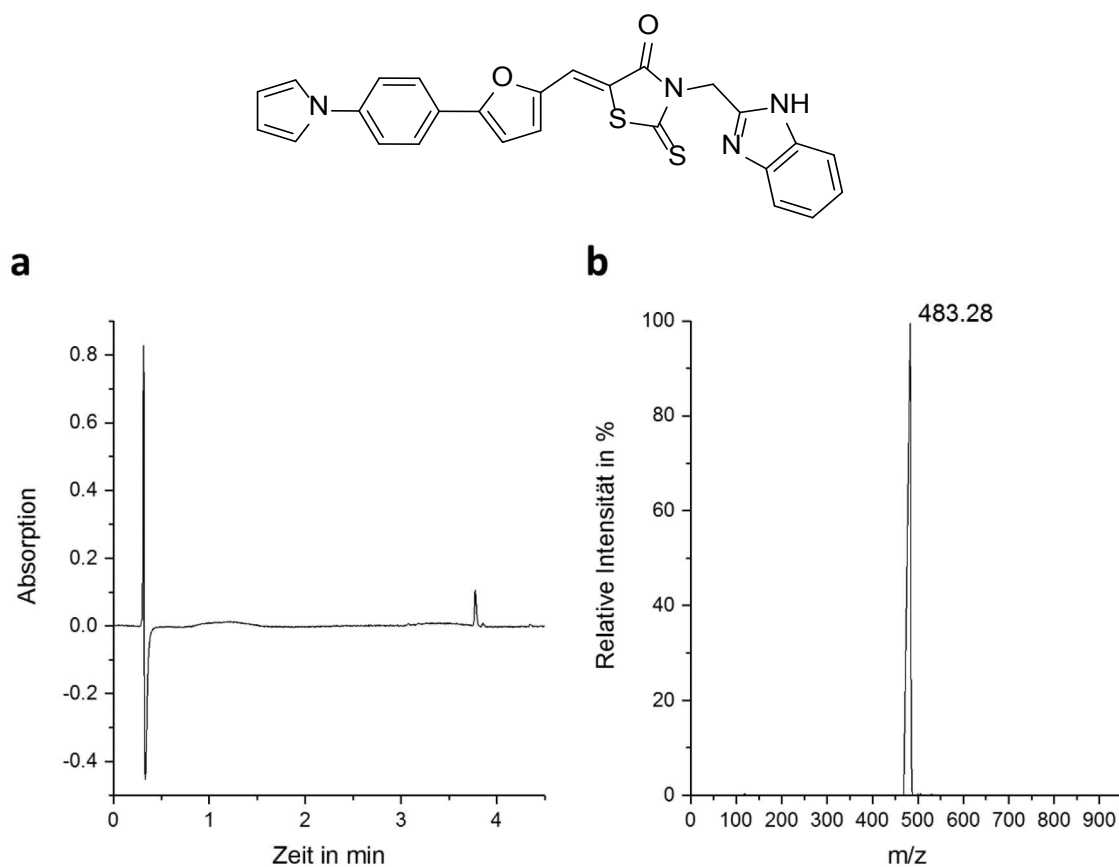


Abbildung 56. Strukturformel von BB17, UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (a) und das entsprechende ESI-MS-Spektrum (b).

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 3.77$ min (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+H]^+$ berechnet m/z 483.1, beobachtet m/z 483.3; 98 % Reinheit.

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.94$ (d, 2H), 7.82 (d, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.49 (m, 2H), 7.43 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.13 (m, 2H), 6.30 (t, 2H), 5.43 ppm (s, 3H), 1.20 ppm (s, 1H).

FT-IR (ν [cm^{-1}]) = 3393 (s), 1707 (s), 1600 (m), 1520 (w), 1487 (s), 1425 (w), 1333 (s), 1317 (m), 1303 (m), 1176 (s), 1114 (vw), 1064 (w), 1041 (w), 917 (w), 832 (w), 813 (vw), 792 (w), 740 (m), 726 (s).

MALDI-ToF-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet 483.1, $[M+H]^+$ beobachtet 482.9.

Fmoc-mPEG-OH

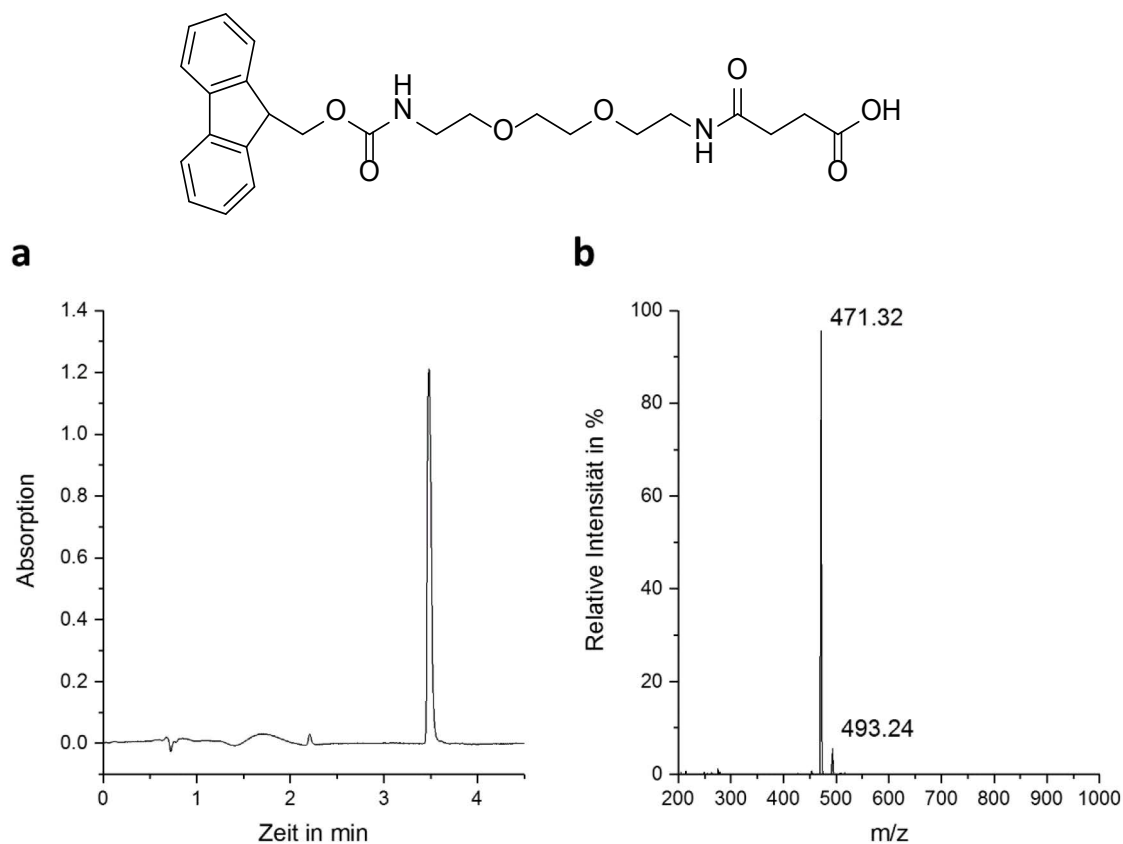


Abbildung 57. Strukturformel von Fmoc-mPEG-OH, UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (a) und das entsprechende ESI-MS-Spektrum (b).

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 3.51$ min (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+H]^+$ berechnet m/z 471.5, beobachtet m/z 471.32; $[M+Na]^+$ berechnet m/z 493.5, beobachtet m/z 493.24.

1H -NMR (300 MHz; $CDCl_3$): $\delta = 7.75$ (2H, d, $J = 7.4$ Hz, Ar-H), 7.55 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, Ar-H), 7.39 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, Ar-H), 7.30 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, Ar-H), 4.54-4.34 (2H, m, Ar-CH-CH₂), 4.27-4.18 (1H, m, Ar-CH), 3.63-3.51 (6H, m, CH₂), 3.48-3.38 (4H, m, CH₂), 3.34-3.27 (2H, m, CH₂), 2.72-2.59 (2H, m, CH₂), 2.53-2.42 ppm (2H, m, CH₂).

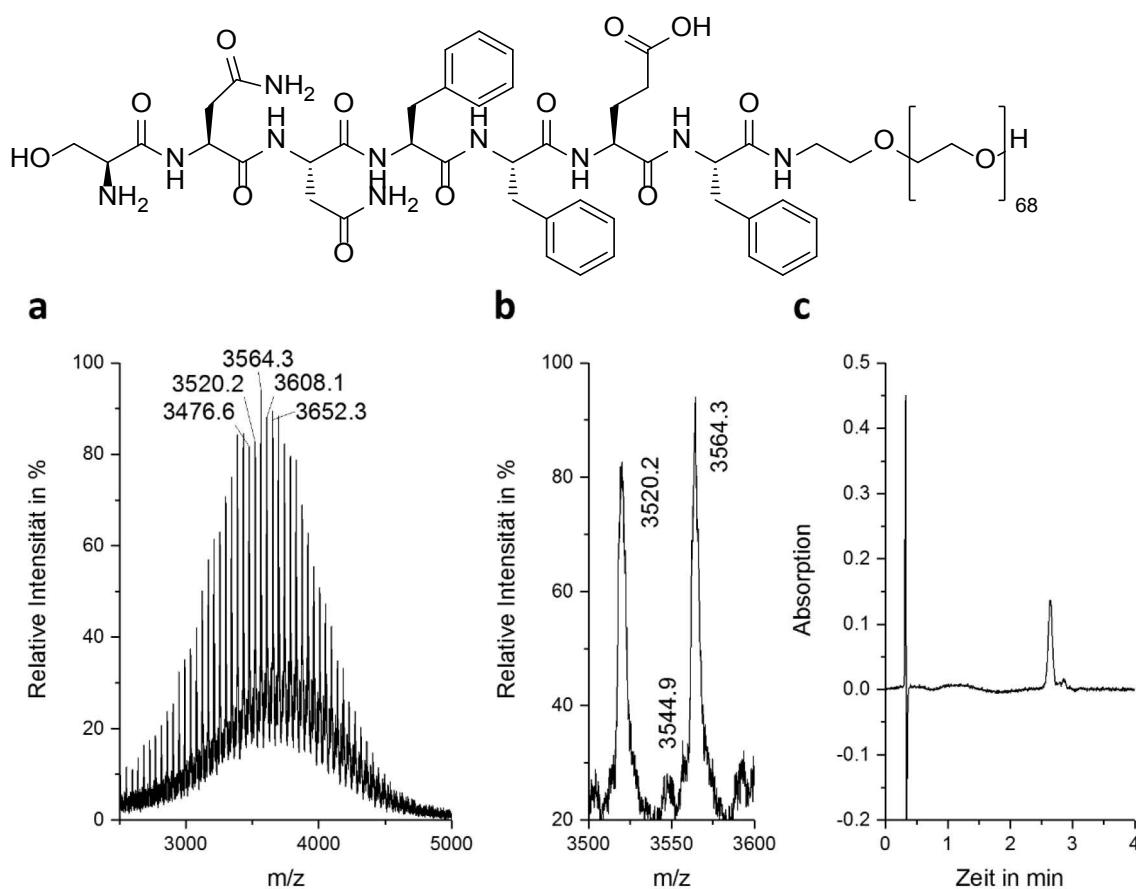
Pep₂-PEG (SNNFFEF-PEG₃₀₀₀)

Abbildung 59. Strukturformel von **Pep₂-PEG** (oben), das MALDI-ToF-MS-Spektrum (a), ein Ausschnitt des Spektrums (b) und UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (c).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 3544.9$

$M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 3543.9 \text{ g/mol}$

$M_{\text{beobachtet}} [M+Na]^+ = m/z \ 3564.3$

$M_{\text{berechnet}} [M+Na]^+ = 3565.3 \text{ g/mol}$

$\Delta m = m/z \ 44.05$ (charakteristisch für PEG-Wiederholungseinheit)

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 2.64 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+4H]^{4+}$ berechnet $m/z \ 975.5$, beobachtet $m/z \ 975.5$; $\Delta m = m/z \ 11$ (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

¹H-NMR (300 MHz, TFA-*d*₁): $\delta = 7.64 - 7.34$ (m, 15 H, Ar-*H*), 5.41 (m, 2 H), 5.18 (m, 1 H), 5.09 (m, 2 H), 4.92 (m, 3 H), 4.69 (m, 1 H), 4.33 – 4.0 (m, 300 H, CH₂ PEG), 3.41 – 3.26 (m, 10 H), 2.83 (m, 2 H), 0.8 ppm (m, 2H).

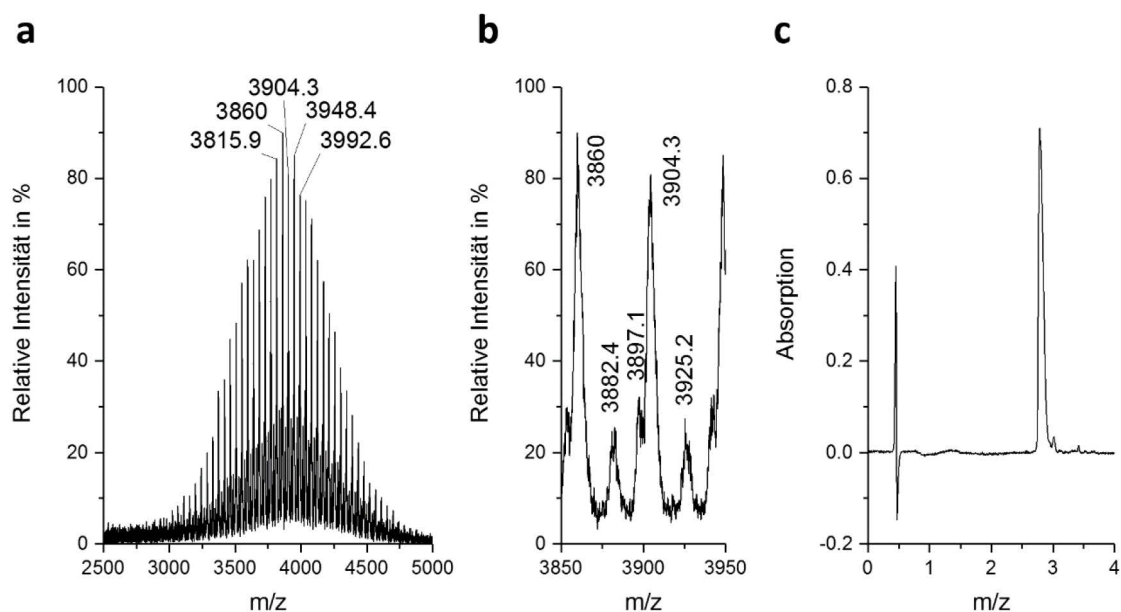
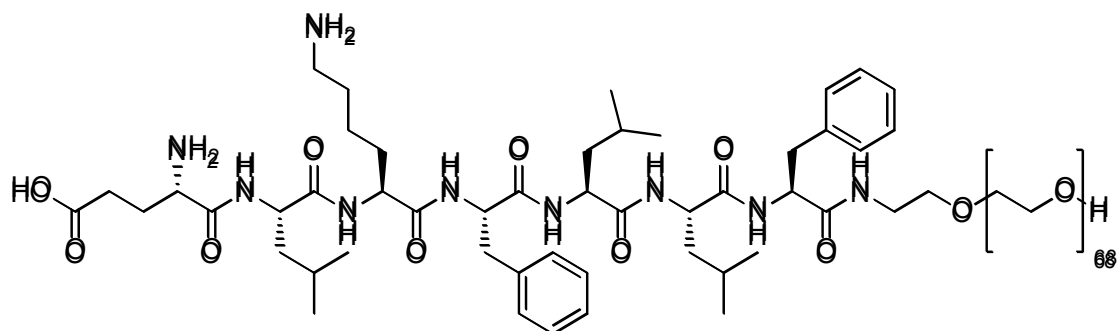
Pep₃-PEG (ELKFLLF-PEG₃₀₀₀)

Abbildung 60. Strukturformel von **Pep₃-PEG** (oben), das MALDI-ToF-MS-Spektrum (a), ein Ausschnitt des Spektrums (b) und UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (c).

**MALDI-ToF-MS:**

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 3860.0$

$M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 3860.1 \text{ g/mol}$

$M_{\text{beobachtet}} [M+Na]^+ = m/z \ 3882.4$

$M_{\text{berechnet}} [M+Na]^+ = 3882.5 \text{ g/mol}$

$M_{\text{beobachtet}} [M+K]^+ = m/z \ 3897.1$

$M_{\text{berechnet}} [M+K]^+ = 3898.5 \text{ g/mol}$

$\Delta m = m/z \ 44.03$ (charakteristisch für PEG-Wiederholungseinheit)

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 2.79$ min (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+4H]^{4+}$ berechnet m/z 976.8, beobachtet m/z 976.9; $\Delta m = m/z$ 11 (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

1H -NMR (300 MHz, TFA- d_1): $\delta = 7.62 - 7.40$ (m, 10 H, Ar-H), 5.25 – 5.16 (m, 2 H), 4.92 (m, 6 H), 4.33 – 4.0 (m, 280 H, CH_2 PEG), 3.52 (m, 2 H), 3.41 (m, 4 H), 3.13 (m, 2 H), 2.70 (m, 2 H), 2.51 (s, 1 H), 2.12 – 1.57 (m, 18 H), 1.29-1.12 (m, 19 H), 0.81 (m, 1 H), 0.77 ppm (m, 3 H).

Pep1-Spacer-PEG (KLFLLLS-GGTERSG-PEG₃₀₀₀)

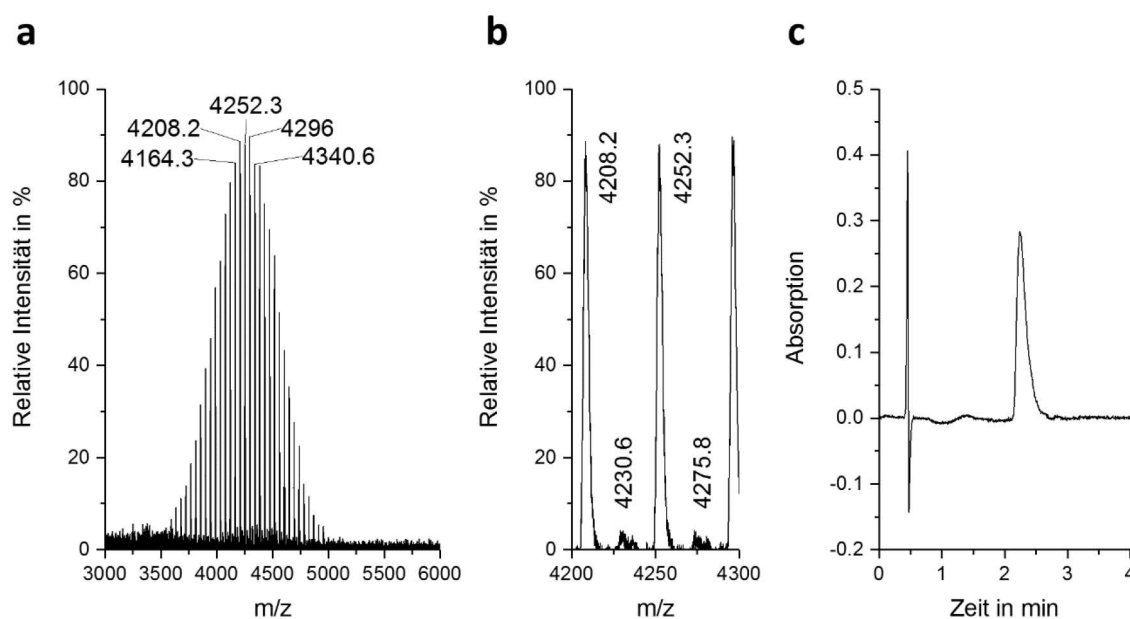


Abbildung 61. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **Pep1-Spacer-PEG** (a), ein Ausschnitt des Spektrums (b) und UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (c).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z$ 4252.3 $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 4252.2$ g/mol

$M_{\text{beobachtet}} [M+Na]^+ = m/z$ 4275.8 $M_{\text{berechnet}} [M+Na]^+ = 4274.2$ g/mol

$\Delta m = m/z$ 44.03 (charakteristisch für PEG-Wiederholungseinheit)

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 2.41$ min (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+7H]^{7+}$ berechnet m/z 639.9, beobachtet m/z 639.9; $\Delta m = m/z$ 6.3 (7-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

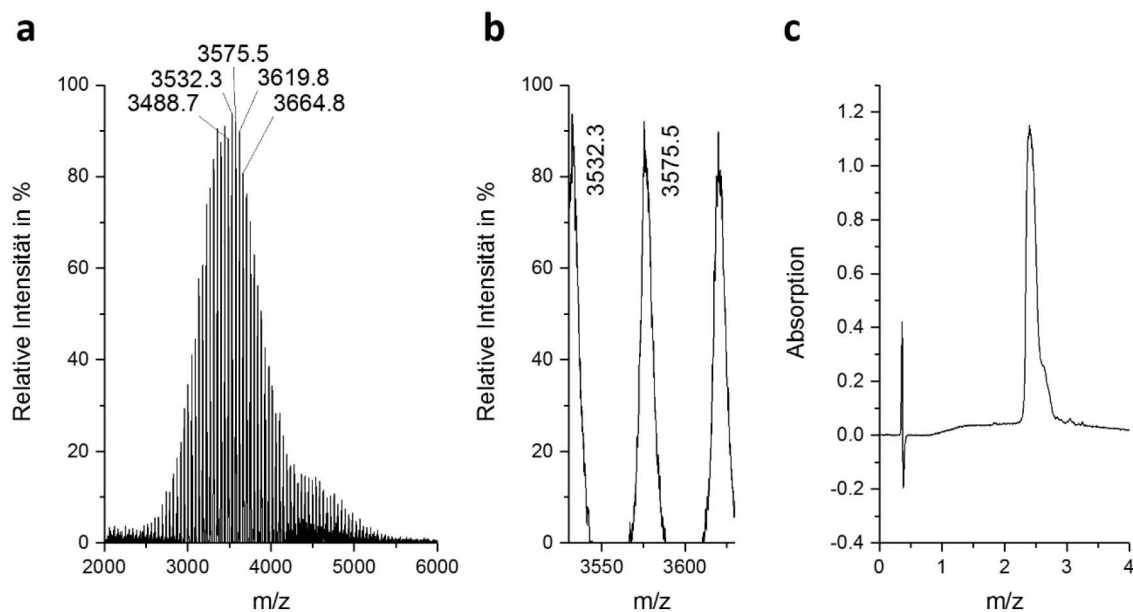
Pep₂-Spacer-PEG (SNNFFEF-GGTERSG-PEG₃₀₀₀)

Abbildung 62. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **Pep₂-Spacer-PEG** (a), ein Ausschnitt des Spektrums (b) und UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (c).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 3575.5$

$M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 3574.9 \text{ g/mol}$

$\Delta m = m/z \ 44.03$ (charakteristisch für PEG-Wiederholungseinheit)

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 2.40 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS:**

$[M+7H]^{7+}$ berechnet $m/z \ 650.0$, beobachtet $m/z \ 650.0$; $\Delta m = m/z \ 6.3$ (7-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

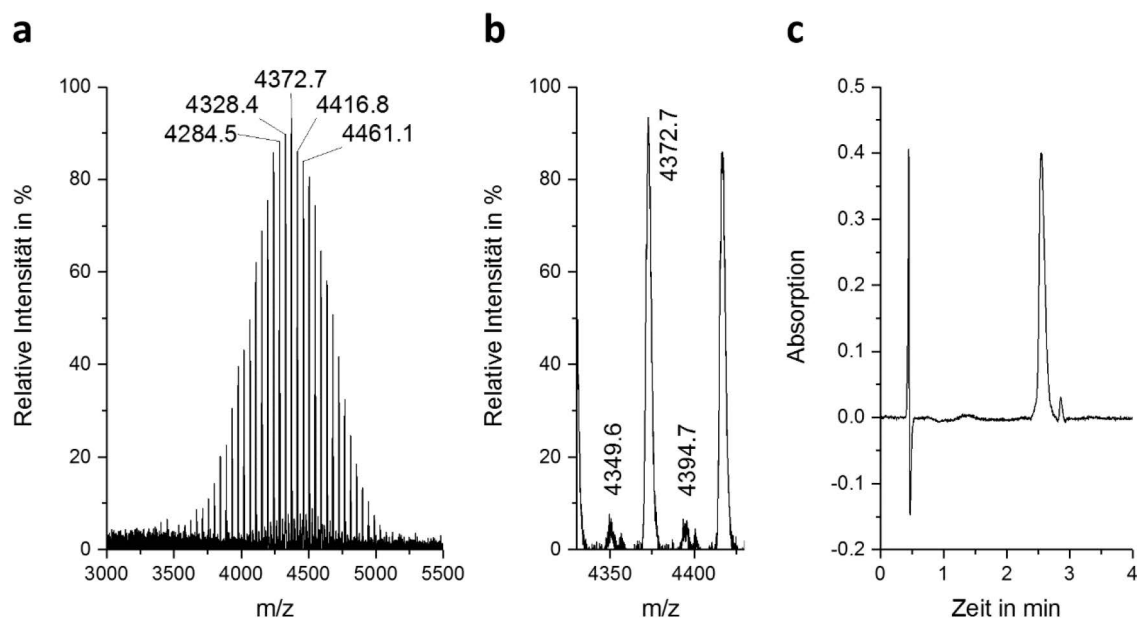
Pep₃-Spacer-PEG (ELKFLLF-GGTERSG-PEG₃₀₀₀)

Abbildung 63. MALDI-ToF-MS-Spektrum von **Pep₃-Spacer-PEG** (a), ein Ausschnitt des Spektrums (b) und UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (c).

MALDI-ToF-MS:

$$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 4372.7$$

$$M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 4372.3 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{beobachtet}} [M+Na]^+ = m/z \ 4394.7$$

$$M_{\text{berechnet}} [M+Na]^+ = 4394.3 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = m/z \ 44.03 \text{ (charakteristisch für PEG-Wiederholungseinheit)}$$

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 2.55 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+7H]^{7+}$ berechnet $m/z \ 650.7$, beobachtet $m/z \ 650.7$; $\Delta m = m/z \ 6.3$ (7-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

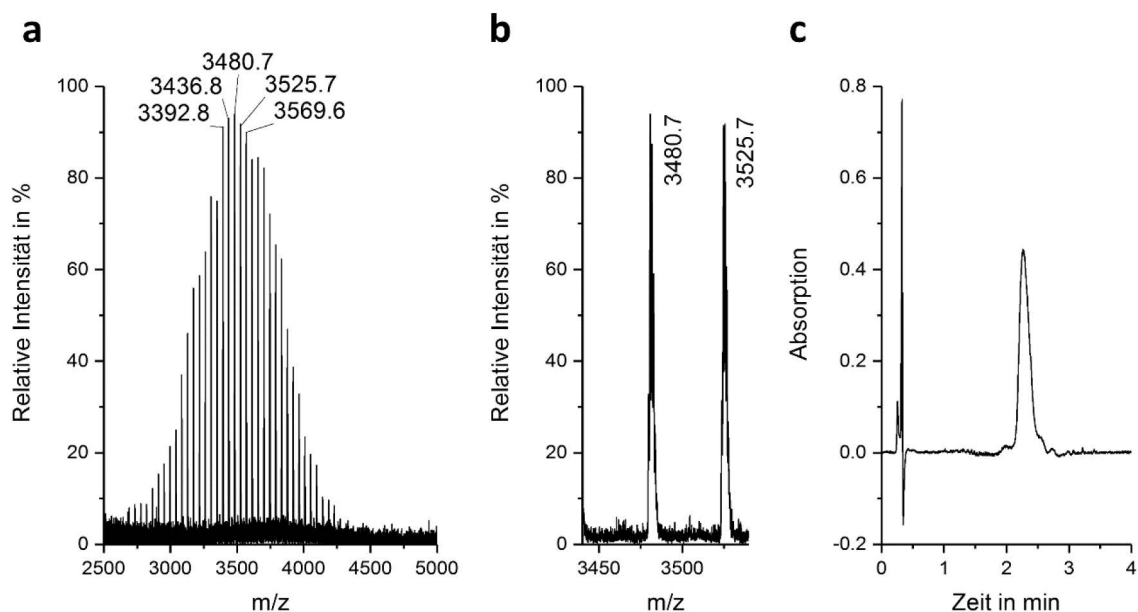
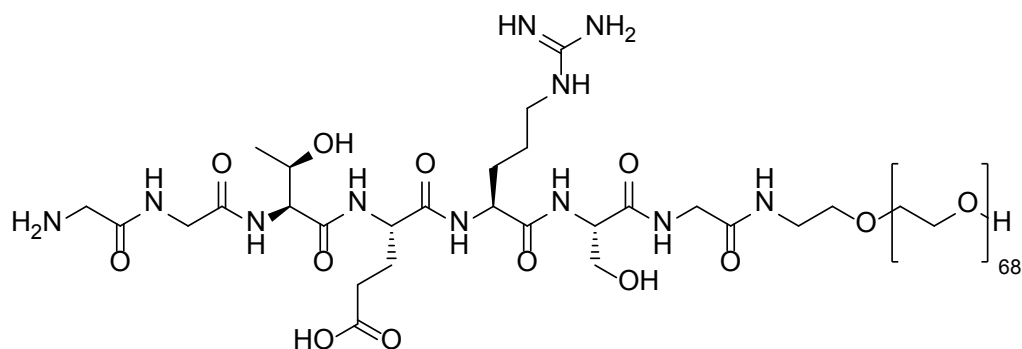
Spacer-PEG (GGTERSG-PEG₃₀₀₀)

Abbildung 65. Strukturformel von **Spacer-PEG** (oben), das MALDI-ToF-MS-Spektrum (a), ein Ausschnitt des Spektrums (b) und UPLC-Chromatogramm bei 210 nm (c).

MALDI-ToF-MS:

$$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 3480.7 \quad M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 3480.6 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = m/z \ 44.03 \text{ (charakteristisch für PEG-Wiederholungseinheit)}$$

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 2.26$ min (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+4H]^{4+}$ berechnet m/z 915.4, beobachtet m/z 915.3; $\Delta m = m/z$ 11 (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

¹H-NMR (300 MHz, TFA-d₁): $\delta = 5.23$ (m, 1 H), 5.09 (m, 1 H), 5.05 (m, 2 H), 4.92 (m, 3 H), 4.69 (m, 2 H), 4.53 (m, 5 H), 4.21 – 4.10 (m, 316 H, CH₂ PEG), 3.94 (m, 2 H), 3.62 (m, 2 H), 2.95 (m, 2 H), 2.52 (m, 1 H), 1.68 (m, 3 H), 0.77 ppm (m, 2 H).

Pal-Pep₁-PEG

MALDI-ToF-MS: $M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 4109.2$, $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ \ 4109.6 \text{ g/mol}$; $\Delta m = m/z \ 44.03$ (1-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

UPLC (210 nm; C18 Säule): $t_R = 3.95 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS:** $[M+4H]^{4+}$ berechnet $m/z \ 1028.2$, beobachtet $m/z \ 1029.1$; $\Delta m = m/z \ 11$ (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

Pal-Pep₂-PEG

MALDI-ToF-MS: $M_{\text{beobachtet}} [M+Na]^+ = m/z \ 3886.9$, $M_{\text{berechnet}} [M+Na]^+ \ 3886.4 \text{ g/mol}$; $\Delta m = m/z \ 44.03$ (1-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

UPLC (210 nm; C18 Säule): $t_R = 3.82 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS:** $[M+4H]^{4+}$ berechnet $m/z \ 966.9$, beobachtet $m/z \ 968.0$; $\Delta m = m/z \ 11$ (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

Pal-Pep₃-PEG

MALDI-ToF-MS: $M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 4142.8$, $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ \ 4142.9 \text{ g/mol}$; $\Delta m = m/z \ 44.03$ (1-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

UPLC (210 nm; C18 Säule): $t_R = 3.85 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS:** $[M+4H]^{4+}$ berechnet $m/z \ 1036.5$, beobachtet $m/z \ 1036.5$; $\Delta m = m/z \ 11$ (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

Pep₃-PEG₅₀₀₀

MALDI-ToF-MS: $M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 5886.1$, $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ \ 5884.6 \text{ g/mol}$; $\Delta m = m/z \ 44.03$ (1-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

UPLC (210 nm; C18 Säule): $t_R = 2.74 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS:** $[M+7H]^{7+}$ berechnet $m/z \ 841.5$, beobachtet $m/z \ 841.5$; $\Delta m = m/z \ 6.3$ (7-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

(Pep₃)₂-PEG

MALDI-ToF-MS: $M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 4906.6$, $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ \ 4904.1 \text{ g/mol}$; $\Delta m = m/z \ 44.03$ (1-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

UPLC (210 nm; C18 Säule): $t_R = 2.67 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS:** $[M+4H]^{4+}$ berechnet $m/z \ 1231.3$, beobachtet $m/z \ 1231.5$; $\Delta m = m/z \ 11$ (4-fach geladene PEG-Wiederholungseinheit).

Tabelle 21. Analytik der Alanin-Scans und der schrittweise aufgebauten Bindesequenz **Pepi-Spacer-PEG**. Alle Massen in m/z. * = Natrium-Addukt.

Seq.-PEG	tr in min	UPLC ESI-MS		MALDI-ToF-MS	
		[M+4H] ⁴⁺ ber.	[M+4H] ⁴⁺ beo.	[M+H] ⁺ ber.	[M+H] ⁺ beo.
ALFLLLS	2.79	943.5	943.6	3767.5	3767.0
KAFLLLS	2.52	947.3	947.3	3782.5	3782.1
KLALLLS	2.52	938.8	938.9	3748.5	3747.6
KLFALLS	2.55	947.3	947.3	3782.5	3782.2
KLFLALS	2.45	947.3	947.3	3782.5	3781.8
KLFLLAS	2.45	947.3	947.3	3782.5	3781.4
KLFLLLA	2.59	953.8	953.8	3808.6	3807.4
ANNFFEF	2.64	971.5	971.6	3879.4	3878.2
SANFFEF	2.67	964.7	964.8	3852.4	3851.4
SNAFFEF	2.65	964.7	964.8	3852.4	3851.5
SNNAFEF	2.57	956.5	956.5	3819.4	3818.1
SNNFAEF	2.57	956.5	956.5	3819.4	3818.8
SNNFFAF	2.63	961.0	961.1	3837.4	3837.2
SNNFFEA	2.47	956.5	956.6	3819.4	3818.1
ALKFLLF	2.59	962.3	962.3	3842.5	3841.7
EAKFLLF	2.52	966.3	966.3	3858.5	3858.5
ELAFLLF	2.87	962.5	962.5	3865.5*	3865.5*
ELKALLF	2.44	957.8	957.6	3827.0	3827.2
ELKFALF	2.53	966.3	966.3	3858.5	3858.5
ELKFLAF	2.55	966.3	966.3	3858.5	3858.5
ELKFLLA	2.46	957.8	957.8	3827.0	3827.5
KLFLLSSGGTERSG	2.41	1118.7	1118.5	4471.7	4471.1
LFLLSSGGTERSG	2.41	1086.6	1086.6	4343.5	4343.5
FLLSSGGTERSG	2.44	1058.4	1058.5	4230.4	4229.3
LLSSGGTERSG	2.40	1021.6	1021.7	4083.2	4081.5
LLSSGGTERSG	2.34	993.3	993.3	3970.1	3969.9
LSGGTERSG	2.31	965.0	966.2	3856.9	3856.8
SGGTERSG	2.31	936.7	936.8	3743.7	3743.7
GGTERSG	2.26	915.3	915.3	3656.7	3657.0
GTERSG	2.25	900.7	900.9	3599.6	3599.7
TERSG	2.31	886.4	886.6	3542.6	3543.4
ERSG	2.31	861.1	861.6	3441.5	3441.5
RSG	2.32	828.8	829.2	3312.3	3312.2
SG	2.48	789.8	790.0	3178.2*	3178.2*
G	2.44	768.4	768.3	3091.1*	3090.7*

CBS (ESKGKLE)

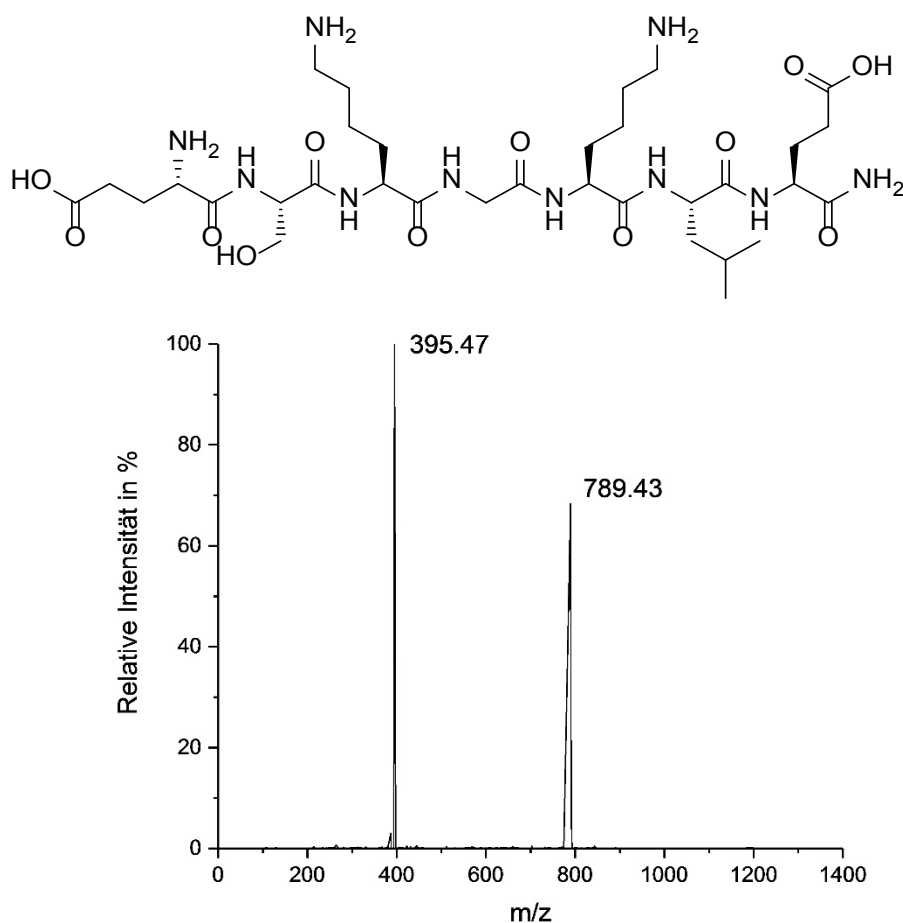


Abbildung 66. Strukturformel von CBS (oben) und ESI-MS-Spektrum (unten).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 789.44$ $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 789.09 \text{ g/mol}$

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 0.351 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**:

$[M+H]^+$ berechnet $m/z \ 789.44$, beobachtet $m/z \ 789.4$, $[M+2H]^{2+}$ berechnet $m/z \ 395.22$, beobachtet $m/z \ 395.47$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10): $\delta = 8.91$ (m, 1 H, H(N) S2), 8.62 (m, 1 H, H(N) K3), 8.47 (m, 1 H, H(N) G4), 8.37 (m, 1 H, H(N) L6), 8.33 (m, 1 H, H(N) E7), 8.24 (m, 1 H, H(N) K5), 7.59 (m, 1 H, NH_2 C-Term), 7.56 (m, 4 H, NH_2 K3/K5), 7.14 (m, 1 H, NH_2 C-Term), 4.58 (m, 1 H, $\text{H}\alpha$ S2), 4.35-4.37 (m, 4 H, $\text{H}\alpha$ K3,K5,L6,E7), 4.14 (m, 1 H, $\text{H}\alpha$ E1), 3.97 (m, 1 H, $\text{H}\alpha$ G4), 3.91 (m, 2 H, $\text{H}\beta$ S2), 3.01 (m, 4 H, $\text{H}\epsilon$ K3/K5), 2.51 (m, 2 H, $\text{H}\gamma$ E1), 2.46 (m, 2 H, $\text{H}\gamma$ E7), 2.18 (m, 2 H, $\text{H}\beta$ E1), 2.13/1.98 (m, 2 H, $\text{H}\beta$ E7), 1.88-1.79 (m, 8 H, $\text{H}\beta/\text{H}\delta$ K3/K5), 1.65 (m, 3 H, $\text{H}\beta/\text{H}\gamma$ L6), 1.48 (m, 4 H, $\text{H}\gamma$ K3/K5), 0.94 ppm (m, 6 H, $\text{H}\delta$ L6).

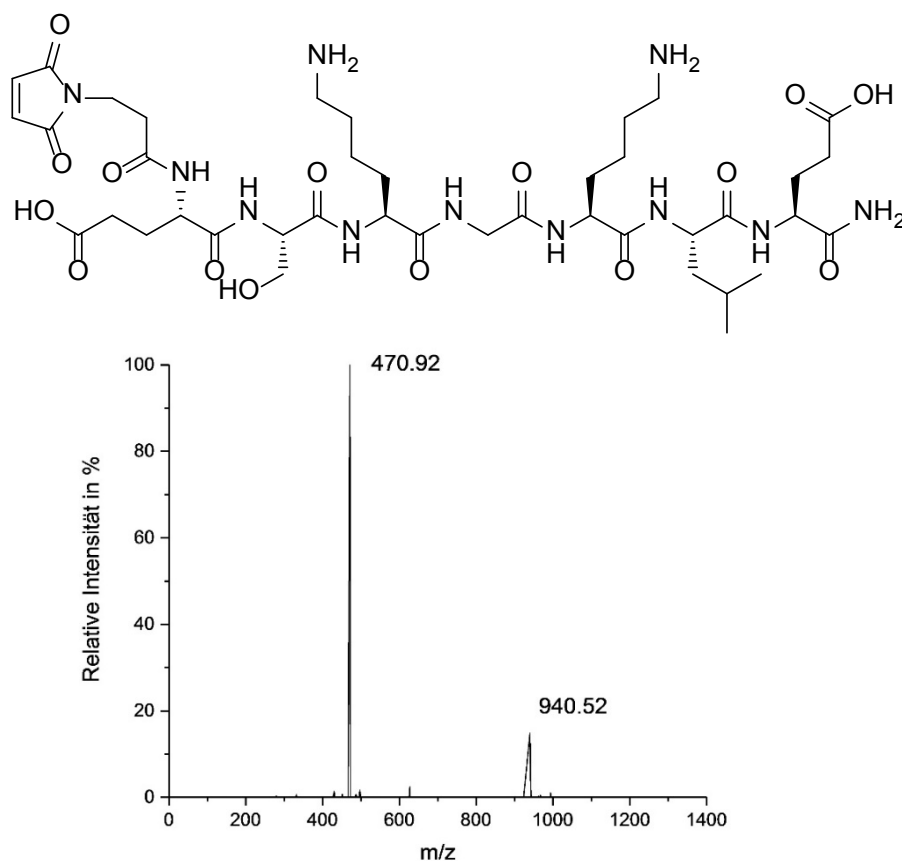
CBS-Mal (Mal-ESKGKLE)

Abbildung 67. Strukturformel von CBS-Mal (oben) und ESI-MS-Spektrum (unten).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z$ 940.29 $M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 940.48 \text{ g/mol}$

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 0.338 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); **ESI-MS**: $[M+H]^+$ berechnet m/z 940.29, beobachtet m/z 940.5, $[M+2H]^{2+}$ berechnet m/z 470.74, beobachtet m/z 470.92.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ 1:1): $\delta = 8.34$ (m, 1 H, H(N) E1), 8.23 (m, 1 H, H(N) G4), 8.17 (m, 1 H, H(N) K3), 8.14 (m, 1 H, H(N) S2), 8.07 (m, 1 H, H(N) L6), 7.97 (m, 1 H, H(N) E7), 7.87 (m, 1 H, H(N) K5), 7.34 (m, 1 H, NH_2 C-Term), 6.99 (m, 1 H, NH_2 C-Term), 6.75 (m, 2 H, H-Aryl Maleimid), 4.58 (m, 1 H, $\text{H}\alpha$ S2), 4.24-4.07 (m, 6 H, $\text{H}\alpha$ E1, S2, K3, K5, L6, E7), 3.73 (m, 1 H, $\text{H}\alpha$ G4), 3.68 (m, 2 H, $\text{H}\beta$ S2), 3.60 (m, 2 H, $\text{H}(\text{C}=\text{O})$ Maleimidbrücke), 2.79 (m, 4 H, $\text{H}\epsilon$ K3/K5), 2.40 (m, 2 H, H(N) Maleimidbrücke), 2.15 (m, 4 H, $\text{H}\gamma$ E1/E7), 1.9-1.7 (m, 4 H, $\text{H}\beta$ E1/E7), 1.70-1.56 (m, 8 H, $\text{H}\beta/\text{H}\delta$ K3/K5), 1.46 (m, 3 H, $\text{H}\beta/\text{H}\gamma$ L6), 1.25 (m, 4 H, $\text{H}\gamma$ K3/K5), 0.77 ppm (m, 6H, $\text{H}\delta$ L6).

CNS (KLKLKKG)

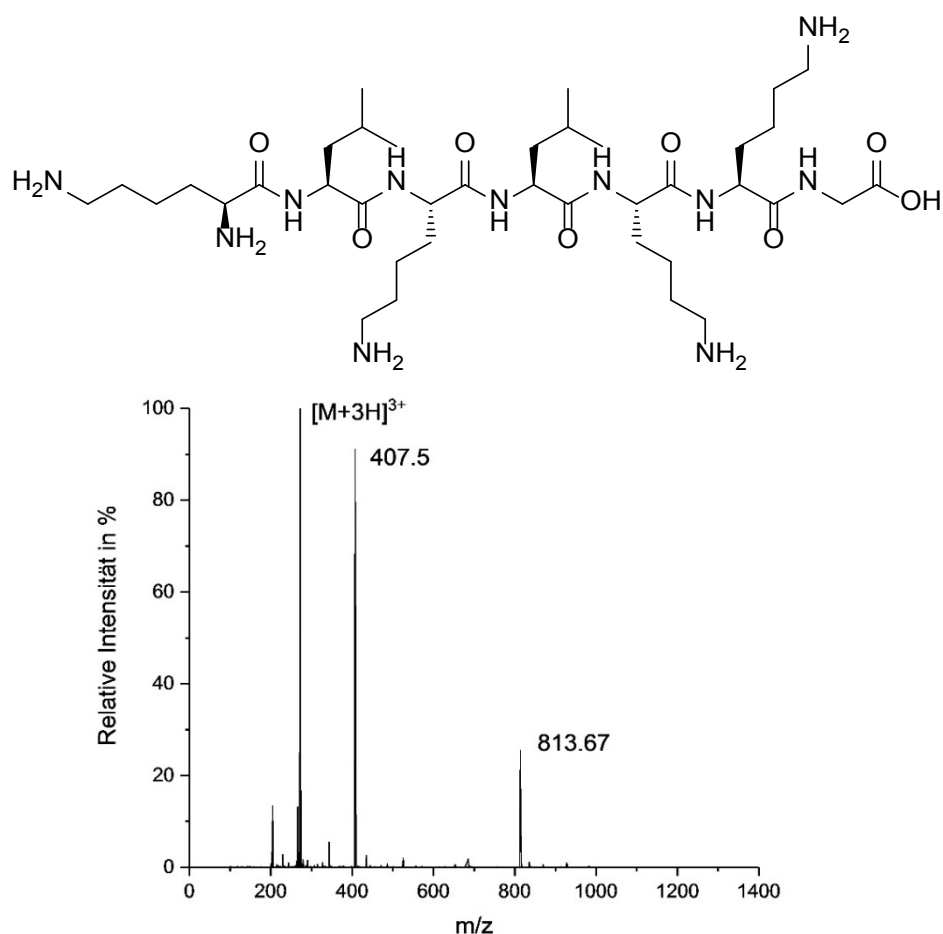


Abbildung 68. Strukturformel von CNS (oben) und ESI-MS-Spektrum (unten).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ = m/z \ 813.23$

$M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = 813.60 \text{ g/mol}$

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 0.340 \text{ min}$ (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); ESI-MS:

$[M+H]^+$ berechnet $m/z \ 813.60$, beobachtet $m/z \ 813.67$, $[M+2H]^{2+}$ berechnet $m/z \ 407.3$, beobachtet $m/z \ 407.5$.

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 9:1): $\delta = 8.65$ (m, 1 H, H(N) L2), 8.53-8.28 (m, 4 H, H(N) K3/L4/K5/K6), 8.52 (m, 1 H, H(N) G7), 7.56 (m, 8 H, NH₂ K1/K3/K5/K6), 7.51 (m, 1 H, NH₂ C-Term), 7.10 (m, 1 H, NH₂ C-Term), 4.37-4.30 (m, 4 H, H α L2/K3/L4/K5/K6), 3.97 (m, 1 H, H α G7), 3.02 (m, 8 H, H ϵ K1/K3/K5/K6), 1.88-1.79 (m, 16 H, H β /H δ K1/K3/K5/K6), 1.63 (m, 6 H, H β /H γ L2/L4), 1.46 (m, 8 H, H γ K1/K3/K5/K6), 0.95-0.91 ppm (m, 12 H, H δ L2/L4).

CNS-Mal (Mal-KLKLKKG)

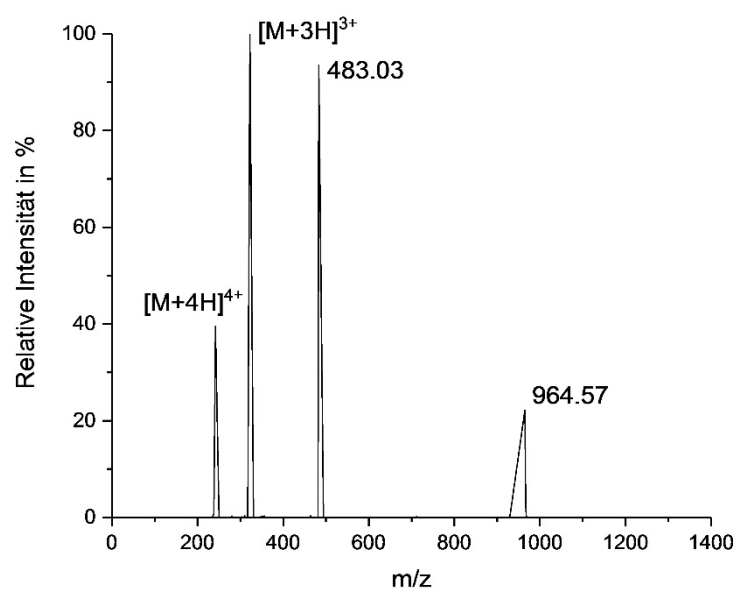
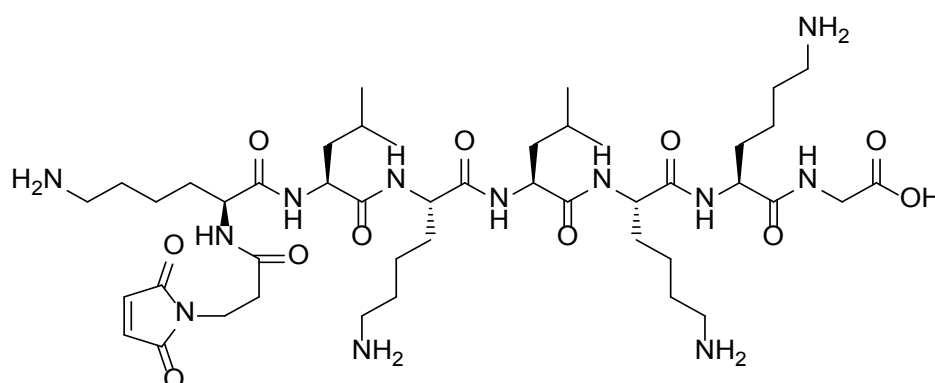


Abbildung 69. Strukturformel von CNS-Mal (oben) und ESI-MS-Spektrum (unten).

MALDI-ToF-MS:

$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^+ =$	m/z 964.21	$M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ =$	964.64 g/mol
$M_{\text{beobachtet}} [M+Na]^+ =$	m/z 986.18	$M_{\text{berechnet}} [M+Na]^+ =$	986.63 g/mol
$M_{\text{beobachtet}} [M+K]^+ =$	m/z 1002.14	$M_{\text{berechnet}} [M+K]^+ =$	1003.74 g/mol

UPLC (210 nm, C18 Säule): $t_R = 0.431$ min (10 % ACN bis 90 % ACN, 4.5 min); ESI-MS:

$[M+H]^+$ berechnet m/z 964.64, beobachtet m/z 964.57, $[M+2H]^{2+}$ berechnet m/z 482.82, beobachtet m/z 483.03.

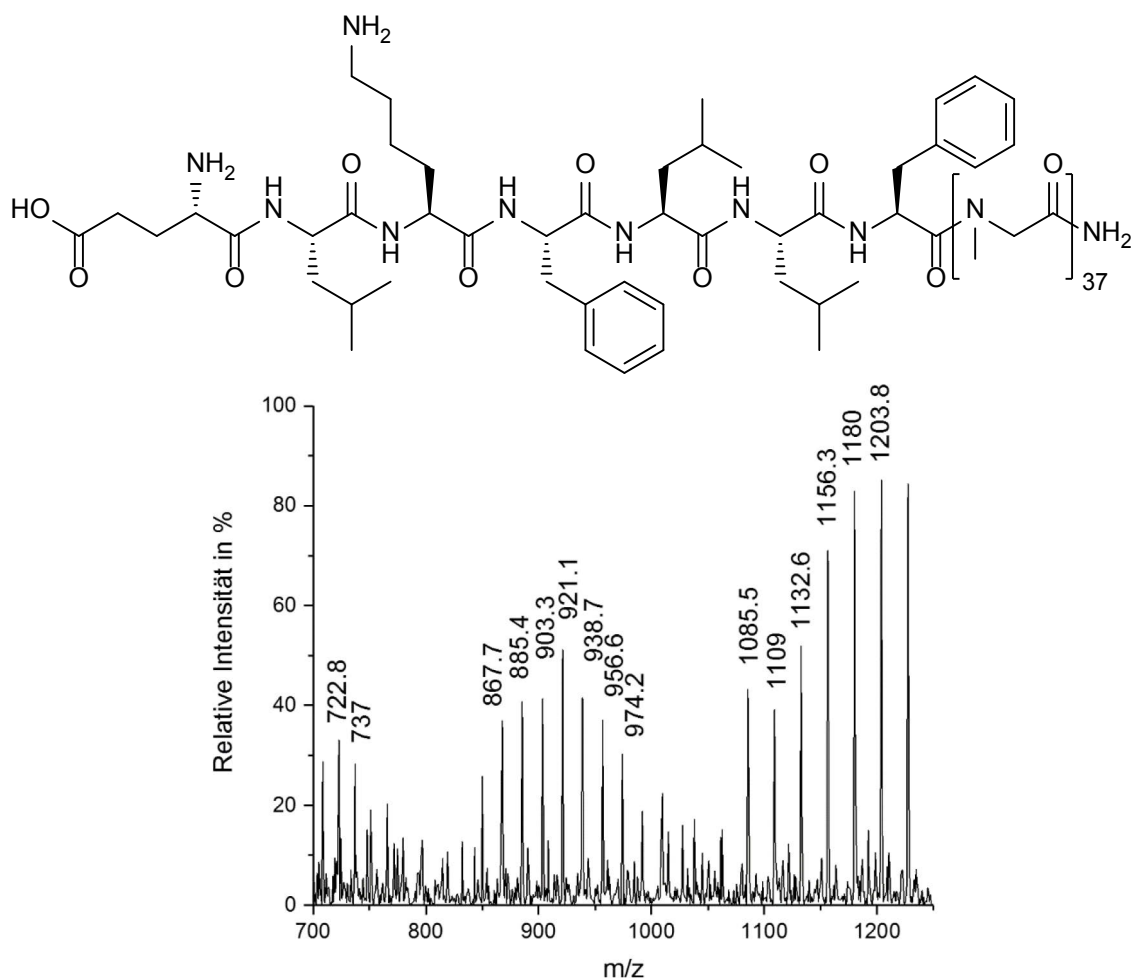
Pep₃-PSar (ELKFLLF-Polysarkosin)

Abbildung 70. Strukturformel von **Pep₃-PSar** (oben) und ESI-MS-Spektrum (unten).

ESI-MS:

$$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^{3+} = m/z \ 1203.8 \quad M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = m/z \ 1203.4$$

$\Delta m = m/z \ 23.8$ (3-fach geladene Polysarkosin-Wiederholungseinheit).

$$M_{\text{beobachtet}} [M+H]^{4+} = m/z \ 867.7 \quad M_{\text{berechnet}} [M+H]^+ = m/z \ 867.3$$

$\Delta m = m/z \ 17.7$ (4-fach geladene Polysarkosin-Wiederholungseinheit).

¹H-NMR (600 MHz, H₂O/D₂O 90:10): δ = 7.34 (m, 10 H, CH aromatisch (Phe)), 4.30 (m, 74 H, CH₂ (PSar)), 3.96 (m, 3 H), 3.74 (m, 2 H) 3.18 (m, 111 H, CH₃ (PSar)), 2.95 (m, 50 H), 1.78 (m, 21 H), 0.94 (m, 21 H).

7 Literaturverzeichnis

1. Kalepu, S.; Nekkanti, V., Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, 5 (5), 442-453.
2. Wieczorek, S.; Krause, E.; Hackbarth, S., et al., Exploiting Specific Interactions toward Next-Generation Polymeric Drug Transporters. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135 (5), 1711-1714.
3. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Khlistunova, I., et al., Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46 (48), 9215-9219.
4. Pickhardt, M.; Lawatscheck, C.; Börner, H. G., et al., Inhibition of Tau protein aggregation by rhodanine-based compounds solubilized via specific formulation additives to improve bioavailability and cell viability. *Current Alzheimer research* **2017**, 14 (7).
5. J. Hoebert, R. L., P. Stephens, The World Medicines Situation 2011: Pharmaceutical Consumption. *World Health Organization* **2011**.
6. Tat Kare, D., Oncology/Cancer Drugs Market: Opportunity Analysis and Industry Forecast 2013-2020. *Market Research Report* **2015**.
7. Willyard, C., The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature (London, U. K.)* **2017**, 543 (7643), 15.
8. Beck, M., [Orphan drugs : New opportunities for the treatment of rare diseases]. *Internist (Berl)* **2016**, 57 (11), 1132-1138.
9. DiMasi, J. A.; Grabowski, H. G.; Hansen, R. W., Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics* **2016**, 47, 20-33.
10. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G., The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* **2003**, 22 (2), 151-185.
11. M. Steedman, K. T., M. Stockbridge, C. Korba, S. Shah, M. Thaxter, A new future for R&D? Measuring the return from pharmaceutical innovation 2017. *Deloitte, Global Data* **2017**.
12. Amreddy, N.; Babu, A.; Muralidharan, R., et al., Chapter Five - Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery. In *Advances in Cancer Research*, Tew, K. D.; Fisher, P. B., Eds. Academic Press: 2018; Vol. 137, pp 115-170.
13. Torre, B. G.; Albericio, F., The Pharmaceutical Industry in 2016. An Analysis of FDA Drug Approvals from a Perspective of the Molecule Type. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2017**, 22 (3).
14. Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L., How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5, 993.
15. Kinch, M. S.; Griesenauer, R. H., 2017 in review: FDA approvals of new molecular entities. *Drug Discovery Today* **2018**, 23 (8), 1469-1473.
16. Mullard, A., 2017 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery* **2018**, 17, 81.
17. Kerns, E. H.; Di, L., Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, 8 (7), 316-323.
18. Landro, J. A.; Taylor, I. C. A.; Stirtan, W. G., et al., HTS in the new millennium: The role of pharmacology and flexibility. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000**, 44 (1), 273-289.

19. Drews, J., Drug discovery: a historical perspective. *Science (New York, N.Y.)* **2000**, 287 (5460), 1960-4.
20. Deprez-Poulain, R.; Deprez, B., Facts, figures and trends in lead generation. *Curr. Top. Med. Chem. (Sharjah, United Arab Emirates)* **2004**, 4 (6), 569-580.
21. Bains, W., Failure rates in drug discovery and development: Will we ever get any better? *RJ Communications and Media Tld.* **2004**.
22. Gabor, F.; Fillafer, C.; Neutsch, L., et al., Improving Oral Delivery. In *Drug Delivery*, Schäfer-Korting, M., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; pp 345-398.
23. Charman, W. N., Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery—Some emerging concepts. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 89 (8), 967-978.
24. Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A., et al., Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacological Reviews* **2013**, 65 (1), 315.
25. Di, L.; Kerns, E. H.; Carter, G. T., Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design* **2009**, 15 (19), 2184-2194.
26. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W., et al., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46 (1), 3-26.
27. Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J., A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal of Combinatorial Chemistry* **1999**, 1 (1), 55-68.
28. Athar, M.; Lone, M. Y.; Jha, P. C., First protein drug target's appraisal of lead-likeness descriptors to unfold the intervening chemical space. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2017**, 72, 272-282.
29. Mandlik, V.; Bejugam, P. R.; Singh, S., Chapter 6 - Application of Artificial Neural Networks in Modern Drug Discovery. In *Artificial Neural Network for Drug Design, Delivery and Disposition*, Puri, M.; Pathak, Y.; Sutariya, V. K.; Tippiraju, S.; Moreno, W., Eds. Academic Press: Boston, 2016; pp 123-139.
30. R. Williams, A. W., C. Miller, Formulating Poorly Water Soluble Drugs. *Advances in the Pharmaceutical Sciences* **2016**.
31. Bobo, D.; Robinson, K. J.; Islam, J., et al., Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research* **2016**, 33 (10), 2373-2387.
32. Peck, R. W.; Lendrem, D. W.; Grant, I., et al., Why is it hard to terminate failing projects in pharmaceutical R&D? *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, 14, 663.
33. Anselmo, A. C.; Mitragotri, S., An Overview of Clinical and Commercial Impact of Drug Delivery Systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, 190, 15-28.
34. Savla, R.; Browne, J.; Plassat, V., et al., Review and analysis of FDA approved drugs using lipid-based formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2017**, 43 (11), 1743-1758.

35. Allen, T. M.; Cullis, P. R., Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* (New York, N.Y.) **2004**, 303 (5665), 1818.
36. Nan, A., Chapter 47 - Miscellaneous Drugs, Materials, Medical Devices and Techniques. In *Side Effects of Drugs Annual*, Ray, S. D., Ed. Elsevier: 2015; Vol. 37, pp 603-619.
37. Gelderblom, H.; Verweij, J.; Nooter, K., et al., Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer* **2001**, 37 (13), 1590-1598.
38. Gradishar, Significantly longer progression-free survival with nab-paclitaxel compared with docetaxel as first-line therapy for metastatic breast cancer (Journal of Clinical Oncology (2009) 27 (3611-3619)). *Journal of Clinical Oncology* **2011**, 29 (19), 2739.
39. Rajappa, S.; Joshi, A.; Doval, D. C., et al., Novel formulations of docetaxel, paclitaxel and doxorubicin in the management of metastatic breast cancer. *Oncology Letters* **2018**, 16 (3), 3757-3769.
40. Feio, D. C. A.; De Oliveira, N. C. L.; Pereira, E. L. R., et al., Organic effects of associating paclitaxel with a lipid-based nanoparticle system on a nonhuman primate, *Cebus apella*. *International Journal of Nanomedicine* **2017**, 12, 3827-3837.
41. Scott, R. C.; Crabbe, D.; Krynska, B., et al., Aiming for the heart: targeted delivery of drugs to diseased cardiac tissue. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, 5 (4), 459-470.
42. Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, 4 (2), 145-160.
43. Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N., et al., PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, 99, 28-51.
44. Daraee, H.; Etemadi, A.; Kouhi, M., et al., Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* **2016**, 44 (1), 381-391.
45. Li, W.; Szoka Jr, F. C., Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical Research* **2007**, 24 (3), 438-449.
46. Fruijtier-Pöloth, C., Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology* **2005**, 214 (1), 1-38.
47. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J., et al., Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology* **2013**, 8, 772.
48. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S., et al., Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104 (7), 2050.
49. Veronese, F. M.; Pasut, G., PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* **2005**, 10 (21), 1451-1458.
50. Alconcel, S. N. S.; Baas, A. S.; Maynard, H. D., FDA-approved poly(ethylene glycol)–protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry* **2011**, 2 (7), 1442-1448.
51. Pino, P. d.; Pelaz, B.; Zhang, Q., et al., Protein corona formation around nanoparticles – from the past to the future. *Materials Horizons* **2014**, 1 (3), 301-313.
52. Pelegri-O'Day, E. M.; Lin, E.-W.; Maynard, H. D., Therapeutic Protein–Polymer Conjugates: Advancing Beyond PEGylation. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136 (41), 14323-14332.

53. Muggia, F.; Hamilton, A., Phase III data on Caelyx® in ovarian cancer. *European Journal of Cancer* **2001**, 37, 15-18.
54. Chen, S.; Florinas, S.; Teitgen, A., et al., Controlled Fab installation onto polymeric micelle nanoparticles for tuned bioactivity. *Science and Technology of Advanced Materials* **2017**, 18 (1), 666-680.
55. Pelaz, B.; Alexiou, C.; Alvarez-Puebla, R. A., et al., Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* **2017**, 11 (3), 2313-2381.
56. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64 (SUPPL.), 37-48.
57. Zhao, B.; Serrano, M. A. C.; Gao, J., et al., Self-assembly of random co-polymers for selective binding and detection of peptides. *Polymer Chemistry* **2018**, 9 (9), 1066-1071.
58. Topel, Ö.; Çakır, B. A.; Budama, L., et al., Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *J. Mol. Liq.* **2013**, 177, 40-43.
59. Sezgin-bayindir, Z.; Ergin, A. D.; Parmaksiz, M., et al., Evaluation of various block copolymers for micelle formation and brain drug delivery: In vitro characterization and cellular uptake studies. *J. Drug. Deliv. Sci. Tec.* **2016**, 36, 120-129.
60. Hildmann, A.; Kairaliyeva, T.; Danker, K., et al., Adsorption characteristics of the alkyl phospholipid Inositol-C2-PAF at the solution/air interface. *Colloid. Surface A* **2017**, 532, 578-582.
61. Anraku, Y.; Kuwahara, H.; Fukusato, Y., et al., Glycaemic control boosts glucosylated nanocarrier crossing the BBB into the brain. *Nature Communications* **2017**, 8 (1), 1001.
62. Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E., et al., Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* **2010**, 37 (1), 13-25.
63. Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S., et al., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 751.
64. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T., et al., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release* **2000**, 65 (1-2), 271-284.
65. Liu, J.; Huang, Y.; Kumar, A., et al., PH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances* **2014**, 32 (4), 693-710.
66. Linenberger, M. L., CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* **2004**, 19, 176.
67. Torchilin, V. P.; Lukyanov, A. N.; Gao, Z., et al., Immunomicelles: Targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100 (10), 6039-6044.
68. Cirstoiu-Hapca, A.; Buchegger, F.; Bossy, L., et al., Nanomedicines for active targeting: Physico-chemical characterization of paclitaxel-loaded anti-HER2 immunonanoparticles and in vitro functional studies on target cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 38 (3), 230-237.

69. Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M., et al., Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* **2000**, 351 (1), 95-105.
70. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M., et al., The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochemical Journal* **2007**, 408 (3), 297-315.
71. Behrendt, R.; White, P.; Offer, J., Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science* **2016**, 22 (1), 4-27.
72. Chun, R. F., New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell biochemistry and function* **2012**, 30 (6), 445-56.
73. Traber, M. G.; Kayden, H. J., Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low-density lipoprotein. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1984**, 40 (4), 747-751.
74. Artursson, P.; Edman, P.; Laakso, T., et al., Characterization of polyacryl starch microparticles as carriers for proteins and drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1984**, 73 (11), 1507-1513.
75. Huesmann, D.; Sevenich, A.; Weber, B., et al., A head-to-head comparison of poly(sarcosine) and poly(ethylene glycol) in peptidic, amphiphilic block copolymers. *Polymer* **2015**, 67, 240-248.
76. Das, D.; Pal, S., Modified biopolymer-dextrin based crosslinked hydrogels: application in controlled drug delivery. *RSC Advances* **2015**, 5 (32), 25014-25050.
77. Wang, Y.-C.; Liu, X.-Q.; Sun, T.-M., et al., Functionalized micelles from block copolymer of polyphosphoester and poly(ϵ -caprolactone) for receptor-mediated drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2008**, 128 (1), 32-40.
78. Eckhardt, D.; Groenewolt, M.; Krause, E., et al., Rational design of oligopeptide organizers for the formation of poly(ethylene oxide) nanofibers. *Chem. Commun.* **2005**, (22), 2814-2816.
79. Butz, S.; Rawer, S.; Rapp, W., et al., Immunization and affinity purification of antibodies using resin-immobilized lysine-branched synthetic peptides. *Pept Res* **1994**, 7 (1), 20-23.
80. Burkoth, T. S.; Benzinger, T. L. S.; Jones, D. N. M., et al., C-terminal PEG blocks the irreversible step in β -amyloid(10-35) fibrillogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120 (30), 7655-7656.
81. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (14), 2149-2154.
82. Han, S. Y.; Kim, Y. A., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, 60 (11), 2447-2467.
83. Hanßke, F.; Kemnitz, E.; Börner, G. H., Generic biocombinatorial strategy to select tailor-made stabilizers for sol-gel nanoparticle synthesis. *Small* **2015**, 11, 4303-4308.
84. Samsoninkova, V.; Seidt, B.; Hanßke, F., et al., Peptide-polymer conjugates for bio-inspired compatibilization of internal composite interfaces: Via specific interactions toward stiffer and tougher materials. *Adv. Mater. Interf.* **2016**, 4, 1600501.
85. Hanßke, F.; Bas, O.; Vaquette, C., et al., Via precise interface engineering toward synthetic composites with improved mechanical properties and 3D printing processability. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 5037-5047.
86. Wilke, P.; Börner, H. G., Mussel-Glue Derived Peptide-Polymer Conjugates to Realize Enzyme-Activated Antifouling Coatings. *ACS Macro Letters* **2012**, 1 (7), 871-875.

87. Wilke, P.; Helfricht, N.; Mark, A., et al., A direct biocombinatorial strategy towards next generation, mussel-glue inspired saltwater adhesives. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12667-12674.
88. Wieczorek, S.; Dallmann, A.; Kochovski, Z., et al., Advancing amphiphilic drug-formulation additives toward precision additives with peptide interlayer mediated release and cost effective reservoir. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9349–9352.
89. Wieczorek, S.; Vigne, S.; Masini, T., et al., Combinatorial Screening for Specific Drug Solubilizers with Switchable Release Profiles. *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15* (1), 82-89.
90. Wieczorek, S.; Krause, E.; Hackbarth, S., et al., Exploiting specific interactions toward next-generation polymeric drug transporters. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1711–1714.
91. Wieczorek, S.; Remmler, D.; Masini, T., et al., Fine-tuning Nanocarriers Specifically toward Cargo: A Competitive Study on Solubilizing Related Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (3), 760-767.
92. Lawatscheck, C.; Pickhardt, M.; Wieczorek, S., et al., Generalizing the concept of specific compound formulation additives toward non-fluorescent drugs: A solubilization study on potential anti-Alzheimer active small molecule compounds. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2016**, *55*, 8752 –8756.
93. Zabihi, F.; Wieczorek, S.; Dimd, M., et al., Intradermal Drug Delivery by Nanogel-Peptide Conjugates; Specific and Efficient Transport of Temoporfin. *J. Controlled Release* **2016**, *242*, 35-41.
94. Hartmann, L.; Börner, H. G., Precision Polymers: Monodisperse, monomer-sequence defined segments to target future demands of polymers in medicine. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3425-3431.
95. Schwemmer, T.; Baumgartner, J.; Faivre, D., et al., Peptide-mediated nanoengineering of inorganic particle surfaces: A general route toward surface functionalization via peptide adhesion domains. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2385-2391.
96. Große, S.; Wilke, P.; Börner, H. G., Easy Access to Functional Patterns on Cellulose Paper by Combining Laser Printing and Material-Specific Peptide Adsorption. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (37), 11266-11270.
97. Organization, W. H., Facts on dementia. **2017**.
98. International, A. s. D., World Alzheimer Report 2018. **2018**.
99. Kopelman, M. D.; Thomson, A. D.; Guerrini, I., et al., The Korsakoff Syndrome: Clinical Aspects, Psychology and Treatment. *Alcohol and Alcoholism* **2009**, *44* (2), 148-154.
100. Services, U. S. D. o. H. H., Estimates of Funding for Various Research, Condition, and Disease Categories. *Research Portfolio Online Reporting Tools* **2018**.
101. Jansen, W. J.; Ossenkoppele, R.; Knol, D. L., et al., Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: A meta-analysis. *JAMA* **2015**, *313* (19), 1924-1938.
102. Moreira, P. I.; Carvalho, C.; Zhu, X., et al., Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2010**, *1802* (1), 2-10.
103. Shankar, G. M.; Walsh, D. M., Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Molecular Neurodegeneration* **2009**, *4* (1), 48.

104. Sadigh-Eteghad, S.; Sabermarouf, B.; Majdi, A., et al., Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Medical Principles and Practice* **2015**, 24 (1), 1-10.
105. Gorman, A. M.; McGowan, A.; O'Neill, C., et al., Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences* **1996**, 139, 45-52.
106. Behl, C.; Davis, J. B.; Lesley, R., et al., Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* **1994**, 77 (6), 817-827.
107. Huang, W.-J.; Zhang, X. I. A.; Chen, W.-W., Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports* **2016**, 4 (5), 519-522.
108. Demuro, A.; Parker, I.; Stutzmann, G. E., Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* **2010**, 285 (17), 12463-8.
109. Soscia, S. J.; Kirby, J. E.; Washicosky, K. J., et al., The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid β -Protein Is an Antimicrobial Peptide. *PLOS ONE* **2010**, 5 (3), e9505.
110. Willem, M.; Tahirovic, S.; Busche, M. A., et al., η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **2015**, 526, 443.
111. Wang, Y.; Mandelkow, E., Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience* **2015**, 17, 22.
112. Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X., et al., Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer research* **2010**, 7 (8), 656-664.
113. Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Cairns, N. J., et al., Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* **1992**, 8 (1), 159-168.
114. Iqbal, K.; del C. Alonso, A.; Chen, S., et al., Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2005**, 1739 (2), 198-210.
115. Timm, T.; Marx, A.; Panneerselvam, S., et al., Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. *BMC Neuroscience* **2008**, 9 (Suppl 2), S9-S9.
116. Kanemaru, K.; Takio, K.; Miura, R., et al., Fetal-Type Phosphorylation of the τ in Paired Helical Filaments. *Journal of Neurochemistry* **1992**, 58 (5), 1667-1675.
117. Kopke, E.; Tung, Y. C.; Shaikh, S., et al., Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non- paired helical filament pool in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268 (32), 24374-24384.
118. Gong, C. X.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* **1994**, 61 (4), 765-772.
119. Kampers, T.; Friedhoff, P.; Biernat, J., et al., RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Letters* **1996**, 399 (3), 344-349.
120. Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M. G., et al., Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **1996**, 383, 550.
121. Sultan, A.; Nessler, F.; Violet, M., et al., Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286 (6), 4566-4575.
122. Lei, P.; Ayton, S.; Finkelstein, D. I., et al., Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nature Medicine* **2012**, 18, 291.

123. Kimura, T.; Whitcomb, D. J.; Jo, J., et al., Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2014**, 369 (1633).
124. Zempel, H.; Mandelkow, E. M., Linking Amyloid- β and Tau: Amyloid- β Induced Synaptic Dysfunction via Local Wreckage of the Neuronal Cytoskeleton. *Neurodegenerative Diseases* **2012**, 10 (1-4), 64-72.
125. Bloom, G. S., Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology* **2014**, 71 (4), 505-8.
126. Hardy, J.; Selkoe, D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, 297 (5580), 353-6.
127. Korczyn, A. D., Why have we failed to cure alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 29 (2), 275-282.
128. Courtney, C.; Farrell, D.; Gray, R., et al., Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. *Lancet* **2004**, 363 (9427), 2105-2115.
129. Kumar, V.; Anand, R.; Messina, J., et al., An efficacy and safety analysis of Exelon® in Alzheimer's disease patients with concurrent vascular risk factors. *European Journal of Neurology* **2008**, 7 (2), 159-169.
130. Loy, C.; Schneider, L. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment *Cochrane Database Syst Rev* [Online], 2006, p. CD001747. PubMed. (accessed 2006).
131. McShane, R.; Areosa Sastre, A.; Minakaran, N. Memantine for dementia *Cochrane Database Syst Rev* [Online], 2006, p. CD003154. PubMed. (accessed 2006).
132. Talesa, V. N., Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **2001**, 122 (16), 1961-1969.
133. Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H., et al., Chapter 53: Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. In *Progress in Brain Research*, Cuello, A. C., Ed. Elsevier: 1993; Vol. 98, pp 431-438.
134. Ali, T. B.; Schleret, T. R.; Reilly, B. M., et al., Adverse Effects of Cholinesterase Inhibitors in Dementia, According to the Pharmacovigilance Databases of the United-States and Canada. *PLoS ONE* **2015**, 10 (12), e0144337.
135. Lipton, S. A., Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5, 160.
136. Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Zhong, K., Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy* **2014**, 6 (4), 37.
137. Pharma-Unternehmen, v. D. f., Neue Alzheimer-Medikamente in fortgeschrittener Entwicklung. **2018**.
138. van Dyck, C. H., Anti-Amyloid-beta Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biological psychiatry* **2018**, 83 (4), 311-319.
139. Prins, N. D.; Scheltens, P., Treating Alzheimer's disease with monoclonal antibodies: current status and outlook for the future. *Alzheimer's Research & Therapy* **2013**, 5 (6), 56-56.
140. Arun, K. G.; Geoffrey, B.; Lin, H., et al., Memapsin 2 (Beta-Secretase) Inhibitor Drug, between Fantasy and Reality. *Current Alzheimer Research* **2007**, 4 (4), 418-422.

141. Menting, K. W.; Claassen, J. A. H. R., β -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2014**, 6 (165).
142. Wischik, C. M.; Edwards, P. C.; Lai, R. Y., et al., Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, 93 (20), 11213.
143. Chirita, C.; Necula, M.; Kuret, J., Ligand-Dependent Inhibition and Reversal of Tau Filament Formation. *Biochemistry* **2004**, 43 (10), 2879-2887.
144. Taniguchi, S.; Suzuki, N.; Masuda, M., et al., Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280 (9), 7614-23.
145. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E.-M., et al., Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* **2010**, 59 (4), 276-289.
146. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E., Progress and Developments in Tau Aggregation Inhibitors for Alzheimer Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56 (11), 4135-4155.
147. Zeiger, E.; Anderson, B.; Haworth, S., et al., Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental mutagenesis* **1987**, 9 Suppl 9, 1-109.
148. Hotta, N.; Akanuma, Y.; Kawamori, R., et al., Long-Term Clinical Effects of Epalrestat, an Aldose Reductase Inhibitor, on Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes Care* **2006**, 29 (7), 1538.
149. Ansar, M.; Serrano, D.; Papademetriou, I., et al., Biological Functionalization of Drug Delivery Carriers to Bypass Size Restrictions of Receptor-Mediated Endocytosis Independently from Receptor Targeting. *ACS nano* **2013**, 7 (12), 10597-10611.
150. Lawatscheck, C.; Pickhardt, M.; Wieczorek, S., et al., Generalizing the Concept of Specific Compound Formulation Additives towards Non-Fluorescent Drugs: A Solubilization Study on Potential Anti-Alzheimer-Active Small-Molecule Compounds. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55 (30), 8752-8756.
151. Kretzschmar, T.; von Rüden, T., Antibody discovery: phage display. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13 (6), 598-602.
152. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Khlistunova, I., et al., Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2007**, 46 (48), 9215-9219.
153. Inglis, A. S.; Edman, P., Mechanism of cyanogen bromide reaction with methionine in peptides and proteins. I. Formation of imidate and methyl thiocyanate. *Analytical Biochemistry* **1970**, 37 (1), 73-80.
154. Pelliccioli, A. P.; Wirz, J., Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2002**, 1 (7), 441-458.
155. Il'ichev, Y. V.; Schwörer, M. A.; Wirz, J., Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (14), 4581-4595.
156. Holmes, C. P.; Jones, D. G., Reagents for Combinatorial Organic Synthesis: Development of a New o-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid Phase Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60 (8), 2318-2319.
157. Warren, A. D.; Mitchell, D. J.; Gates, P. J., Methodologies for the airbrush application of MALDI matrices. *European Journal of Mass Spectrometry* **2018**, 24 (1), 89-95.

158. Wysocki Vicki, H.; Tsaprailis, G.; Smith Lori, L., et al., Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 35 (12), 1399-1406.
159. Paizs, B.; Suhai, S.; Hargittai, B., et al., Ab initio and MS/MS studies on protonated peptides containing basic and acidic amino acid residues: I. Solvated proton vs. salt-bridged structures and the cleavage of the terminal amide bond of protonated RD-NH₂. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 219 (1), 203-232.
160. Resing Katheryn, A.; Ahn Natalie, G., Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Letters* **2004**, 579 (4), 885-889.
161. Dupré, M.; Cantel, S.; Martinez, J., et al., Occurrence of C-Terminal Residue Exclusion in Peptide Fragmentation by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2012**, 23 (2), 330-346.
162. Steinhardt, J.; Krijn, J.; Leidy, J. G., Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry* **1971**, 10 (22), 4005-4015.
163. Schwaar, T.; Remmler, D.; Börner, H. G., Spec2Seq. Humboldt-Universität zu Berlin: 2018.
164. Bader, A. N.; Hofman, E. G.; Voortman, J., et al., Homo-FRET Imaging Enables Quantification of Protein Cluster Sizes with Subcellular Resolution. *Biophysical Journal* **2009**, 97 (9), 2613-2622.
165. Tramier, M.; Coppey-Moisán, M., Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy for Homo-FRET in Living Cells. In *Methods in Cell Biology*, Academic Press: 2008; Vol. 85, pp 395-414.
166. Yergey, A. L.; Coorsen, J. R.; Backlund, P. S., et al., De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13 (7), 784-791.
167. Chalkley, R. J.; Brinkworth, C. S.; Burlingame, A. L., Side-Chain Fragmentation of Alkylated Cysteine Residues in Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, 17 (9), 1271-1274.
168. Godugu, B.; Neta, P.; Simón-Manso, Y., et al., Effect of N-Terminal Glutamic Acid and Glutamine on Fragmentation of Peptide Ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21 (7), 1169-1176.
169. Kelstrup, C. D.; Hekmat, O.; Francavilla, C., et al., Pinpointing Phosphorylation Sites: Quantitative Filtering and a Novel Site-specific x-Ion Fragment. *Journal of Proteome Research* **2011**, 10 (7), 2937-2948.
170. Simón-Manso, Y.; Neta, P.; Yang, X., et al., Loss of 45 Da from a₂ Ions and Preferential Loss of 48 Da from a₂ Ions Containing Methionine in Peptide Ion Tandem Mass Spectra. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2011**, 22 (2), 280-289.
171. Kilpatrick, L. E.; Neta, P.; Yang, X., et al., Formation of y + 10 and y + 11 Ions in the Collision-Induced Dissociation of Peptide Ions. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2012**, 23 (4), 655-663.
172. Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P., et al., Generation and screening of combinatorial peptide libraries designed for rapid sequencing by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (14), 3900-6.

173. Hu, B. H.; Jones, M. R.; Messersmith, P. B., Method for screening and MALDI-TOF MS sequencing of encoded combinatorial libraries. *Anal Chem* **2007**, 79 (19), 7275-85.
174. Charles, L.; Laure, C.; Lutz, J.-F., et al., MS/MS Sequencing of Digitally Encoded Poly(alkoxyamine amide)s. *Macromolecules* **2015**, 48 (13), 4319-4328.
175. Cavallo, G.; Al Ouahabi, A.; Oswald, L., et al., Orthogonal Synthesis of "Easy-to-Read" Information-Containing Polymers Using Phosphoramidite and Radical Coupling Steps. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, 138 (30), 9417-9420.
176. Bhardwaj, V.; Panicker, M. M.; Udgaonkar, J. B., Fluorescence Anisotropy Uncovers Changes in Protein Packing with Inclusion Growth in a Cellular Model of Polyglutamine Aggregation. *Biochemistry* **2014**, 53 (22), 3621-3636.
177. Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R., et al., Overcoming the PEG-addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure-property relationships to better defined therapeutics. *Polymer Chemistry* **2011**, 2 (9), 1900-1918.
178. Fetsch, C.; Flecks, S.; Gieseler, D., et al., Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolypeptoids with C2-C5 Side Chains in Aqueous Solution. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2015**, 216 (5), 547-560.
179. Wang, X.; Ishida, T.; Kiwada, H., Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *Journal of Controlled Release* **2007**, 119 (2), 236-244.
180. Armstrong, J. K.; Hempel, G.; Koling, S., et al., Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* **2007**, 110 (1), 103-11.
181. Hsieh, Y.-C.; Wang, H.-E.; Lin, W.-W., et al., Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody reduces the therapeutic efficacy and pharmacokinetics of PEGylated liposomes. *Theranostics* **2018**, 8 (11), 3164-3175.
182. Abu Lila, A. S.; Kiwada, H.; Ishida, T., The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *Journal of Controlled Release* **2013**, 172 (1), 38-47.
183. Dams, E. T.; Laverman, P.; Oyen, W. J., et al., Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2000**, 292 (3), 1071-9.
184. Kricheldorf, H. R., Polypeptides and 100 years of chemistry of alpha-amino acid N-carboxyanhydrides. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2006**, 45 (35), 5752-84.
185. Doriti, A.; Brosnan, S. M.; Weidner, S. M., et al., Synthesis of polysarcosine from air and moisture stable N-phenoxycarbonyl-N-methylglycine assisted by tertiary amine base. *Polymer Chemistry* **2016**, 7 (18), 3067-3070.
186. Friedhoff, P.; Schneider, A.; Mandelkow, E.-M., et al., Rapid Assembly of Alzheimer-like Paired Helical Filaments from Microtubule-Associated Protein Tau Monitored by Fluorescence in Solution. *Biochemistry* **1998**, 37 (28), 10223-10230.
187. Pickhardt, M.; Gazova, Z.; von Bergen, M., et al., Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280 (5), 3628-35.

188. Rizzu, P.; Van Swieten, J. C.; Joosse, M., et al., High Prevalence of Mutations in the Microtubule-Associated Protein Tau in a Population Study of Frontotemporal Dementia in the Netherlands. *The American Journal of Human Genetics* **1999**, *64* (2), 414-421.
189. Momeni, P.; Pittman, A.; Lashley, T., et al., Clinical and pathological features of an Alzheimer's disease patient with the MAPT Δ K280 mutation. *Neurobiology of aging* **2009**, *30* (3), 388-393.
190. Pickhardt, M.; Biernat, J.; Hübschmann, S., et al., Time course of Tau toxicity and pharmacologic prevention in a cell model of Tauopathy. *Neurobiology of aging* **2017**, *57*, 47-63.
191. Von Bergen, M.; Barghorn, S.; Li, L., et al., Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local β -structure. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (51), 48165-48174.
192. Wilson, D. M.; Binder, L. I., Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology* **1997**, *150* (6), 2181-2195.
193. Jacobsson, S. O. P.; Fowler, C. J., Characterization of palmitoylethanolamide transport in mouse Neuro-2a neuroblastoma and rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells: comparison with anandamide. *British Journal of Pharmacology* **2001**, *132* (8), 1743-1754.
194. Deutsch, D. G.; Ueda, N.; Yamamoto, S., The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* **2002**, *66* (2), 201-210.
195. Desarnaud, F.; Cadas, H.; Piomelli, D., Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (11), 6030-5.
196. Hillard, C. J.; Wilkison, D. M.; Edgemond, W. S., et al., Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1995**, *1257* (3), 249-256.
197. Ueda, N.; Puffenbarger, R. A.; Yamamoto, S., et al., The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, *108* (1), 107-121.
198. Hu, Y.; Hou, Y.; Wang, H., et al., Polysarcosine as an Alternative to PEG for Therapeutic Protein Conjugation. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29* (7), 2232-2238.
199. Campanella, B.; Bramanti, E., Detection of proteins by hyphenated techniques with endogenous metal tags and metal chemical labelling. *Analyst* **2014**, *139* (17), 4124-4153.
200. de Bang, T. C.; Husted, S., Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2015**, *72*, 45-52.
201. Aioub, M.; Kang, B.; Mackey, M. A., et al., Biological Targeting of Plasmonic Nanoparticles Improves Cellular Imaging via the Enhanced Scattering in the Aggregates Formed. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, *5* (15), 2555-2561.
202. Kneipp, J.; Kneipp, H.; McLaughlin, M., et al., In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates. *Nano Letters* **2006**, *6* (10), 2225-2231.

203. Drescher, D.; Giesen, C.; Traub, H., et al., Quantitative Imaging of Gold and Silver Nanoparticles in Single Eukaryotic Cells by Laser Ablation ICP-MS. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (22), 9684-9688.
204. Ando, J.; Fujita, K.; Smith, N. I., et al., Dynamic SERS Imaging of Cellular Transport Pathways with Endocytosed Gold Nanoparticles. *Nano Letters* **2011**, *11* (12), 5344-5348.
205. Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H., et al., Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science* **2007**, *23* (3), 217.
206. Linscheid Michael, W., Molecules and elements for quantitative bioanalysis: The allure of using electrospray, MALDI, and ICP mass spectrometry side-by-side. *Mass Spectrometry Reviews* **2018**, *0* (0).
207. Perfetto, S. P.; Chattopadhyay, P. K.; Roederer, M., Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Reviews Immunology* **2004**, *4*, 648.
208. Waentig, L.; Techritz, S.; Jakubowski, N., et al., A multi-parametric microarray for protein profiling: simultaneous analysis of 8 different cytochromes via differentially element tagged antibodies and laser ablation ICP-MS. *Analyst* **2013**, *138* (21), 6309-6315.
209. Giesen, C.; Mairinger, T.; Khoury, L., et al., Multiplexed Immunohistochemical Detection of Tumor Markers in Breast Cancer Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (21), 8177-8183.
210. Han, G.; Zhang, S.; Xing, Z., et al., Absolute and Relative Quantification of Multiplex DNA Assays Based on an Elemental Labeling Strategy. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (5), 1466-1471.
211. Han, G.; Chen, S. Y.; Gonzalez Veronica, D., et al., Atomic mass tag of bismuth-209 for increasing the immunoassay multiplexing capacity of mass cytometry. *Cytometry Part A* **2017**, *91* (12), 1150-1163.
212. Lou, X.; Zhang, G.; Herrera, I., et al., Polymer-Based Elemental Tags for Sensitive Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (32), 6111-6114.
213. Miersch, L.; Rüffer, T.; Lang, H., et al., A Novel Water-Soluble Hexanuclear Bismuth Oxido Cluster - Synthesis, Structure and Complexation with Polyacrylate. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2010**, *2010* (30), 4763-4769.
214. Bechara, C.; Sagan, S., Cell-penetrating peptides: 20years later, where do we stand? *FEBS Letters* **2013**, *587* (12), 1693-1702.
215. Koren, E.; Torchilin, V. P., Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends in Molecular Medicine* **2012**, *18* (7), 385-393.
216. Lutz, J.-F., Copper-Free Azide-Alkyne Cycloadditions: New Insights and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (12), 2182-2184.
217. Soriano, A.; Ventura, R.; Molero, A., et al., Adenosine A2A Receptor-Antagonist/Dopamine D2 Receptor-Agonist Bivalent Ligands as Pharmacological Tools to

Detect A2A-D2 Receptor Heteromers. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52 (18), 5590-5602.

218. Eissler, S.; Kley, M.; Bächle, D., et al., Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different wavelengths. *Journal of Peptide Science* **2017**, 23 (10), 757-762.

219. Friedhoff, P.; von Bergen, M.; Mandelkow, E. M., et al., A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95 (26), 15712.

220. Khlistunova, I.; Biernat, J.; Wang, Y., et al., Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281 (2), 1205-14.

221. Wesdemiotis, C.; Solak, N.; Polce Michael, J., et al., Fragmentation pathways of polymer ions. *Mass Spectrometry Reviews* **2011**, 30 (4), 523-559.

8 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgte nach dem von der IUPAC empfohlenen Ein- und Dreibuchstaben-Code (A One-Letter Notation For Amino Acid Sequences, *Iupac-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*, **1971**)

α-CHCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
Aβ	β -Amyloid
Aη	η -Amyloid
ACh	Acetylcholin
ADC	Antikörperkonjugat, (engl.: <i>Antibody-Drug-Conjugate</i>)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
BB17	potentieller ALZHEIMER-Wirkstoff
BSA	Bovines Serum Albumin
cac	Kritische Aggregationskonzentration
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
DC50	mittlere Konzentration für eine Deaggregation
DCM	Dichlormethan
DDS	Wirkstofftransport-System (engl.: <i>Drug Delivery System</i>)
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin

DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
EPR	Erhöhte Permeabilität und Retention (engl.: <i>Enhanced Permeability and Retention</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FA	Fluoreszenzanisotropie
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FDA	U.S.-amerikanische Behörde für Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung (engl.: <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FT-ICR	Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBA	(Hydroxymethyl)benzoesäure
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ITO	Indiumzinnoxid
LA-ICP-MS	Massenspektrometrie mit Laserablation und induktiv gekoppeltem Plasma
Mal	Maleimid
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mDOTA	Maleimid-DOTA
mPEG	Mini-PEG
MS	Massenspektrometrie
MS²	Tandem Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
N2a	Neuro-2a Zelllinie
NCA	N-Carboxyanhydrid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

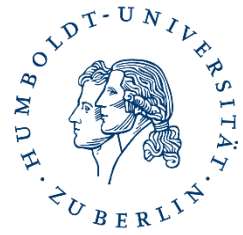
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (engl.: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OBOC	eng.: One-Bead One-Compound
Pal	Palmitinsäure
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
Poc-Sar	N-Phenoxycarbonyl-Sarkosin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RES	Retikulohisiozytäres System
RET	Strahlungsfreie Übergänge (engl.: <i>Radiationless Energy Transfer</i>)
R_h	Hydrodynamischer Radius
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Spec2Seq	Spektrum zu Sequenz (engl.: <i>Spectrum to Sequence</i>)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (engl.: <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
ThS	Thioflavin S
ToF	Flugzeitanalyse (engl.: <i>Time of Flight</i>)
t_R	Retentionszeit
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht
WHO	Weltgesundheitsorganisation

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Hans G. Börner für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen während meiner Promotion bedanken. Die zahlreichen fachlichen Diskussionen haben oft neue Aspekte beleuchtet und damit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenfalls möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen vorstellen zu können. Auch Herrn PD Michael G. Weller gilt besonderer Dank. Die regelmäßigen Treffen haben mich motiviert Probleme von anderen Blickwinkeln aus zu betrachten und neue Konzepte für mein Forschungsprojekt zu wagen. Ein großer Dank gilt ebenso Timm Schwaar, der mit mir zusammen zahlreiche Projekte bewältigt hat. Besonders hervorheben möchte ich hier seine Leistung bei der Entwicklung der Spe2Seq-Software. Ebenso danke ich Mona Bauer für Möglichkeit an einem spannenden Projekt in der anorganischen Chemie mitgewirkt zu haben. Afroditi Doriti danke ich für die Unterstützung bei der Synthese des Polysarkosins. Claudia Donth danke ich für die zahlreichen Messungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Chloé Laure, Gianni Cavallo und Dr. habil. Jean-François Lutz möchte ich für die tolle Zusammenarbeit bei der Bearbeitung des Präzisionspolymerprojektes danken. Auch danke ich Dr. habil. Jean-François Lutz für die Erstellung eines Gutachtens. Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zeit und fachliche Unterstützung. Insbesondere danke ich meinem Labor mit Anna Grafl, Carmen Lawatscheck, Katharina Linkert und Frank Polster, die oft meine gewöhnungsbedürftige Musik hören mussten. Matthias Röber und Justus Horsch danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen und gemeinsamen Pausen. Falk Kubatzki danke ich für sein Engagement bei der Einführung in neue Methoden/Gerätschaften.

Auch der School of Analytical Sciences Adlershof (SALSA) und der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung danke ich für die Finanzierung meiner Promotion und der vielen Konferenzen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung während meines Studiums im In- und Ausland. Auch danke ich meiner Freundin Leonie für ihr offenes Ohr bei kleineren Problemen. Ihr habt mir die Kraft gegeben dieses Studium erfolgreich abzuschließen.



Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Unterschrift